

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCEL HENRIQUE BLANK

PERFIL ANUAL DE ANDRÓGENOS EM GAVIÕES-REAIS (*Harpia harpyja*) E  
SUA CORRELAÇÃO COM COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E FATORES  
AMBIENTAIS

CURITIBA

2015

MARCEL HENRIQUE BLANK

PERFIL ANUAL DE ANDRÓGENOS EM GAVIÕES-REAIS (*Harpia harpyja*) E  
SUA CORRELAÇÃO COM COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E FATORES  
AMBIENTAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Nei Moreira

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Blank, Marcel Henrique

Perfil anual de andrógenos em gaviões-reais (*Harpia harpyja*) e sua correlação com comportamento reprodutivo e fatores ambientais. /

Marcel Henrique Blank. – Curitiba, 2015.

98f.: il. ; 30cm.

Orientador: Nei Moreira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Ave de rapina 2. Andrógenos 3. Ave - Reprodução I. Título II. Moreira, Nei III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (20. ed.) 598.916



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação Zoologia



## TERMO DE APROVAÇÃO

*Marcel Henrique Blank*

**“Perfil Anual de Andrógenos em Gaviões-Reais (*Harpia Harpyja*) e sua Correlação com Comportamento Reprodutivo e Fatores Ambientais”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zoologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Comissão Examinadora:

Professor Dr. Nei Moreira  
Orientador

Dr. Ricardo José Garcia Pereira (USP)  
Membro Externo

Professor Dr. Rogério Ribas Lange - UFPR  
Membro Interno

Curitiba, 28 de agosto de 2015.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
COMISSÃO DE ÉTICA E USO DE ANIMAIS – CEUA

## CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 14/2013-CEUA/Palotina** referente ao projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação de esteroides sexuais em Harpia (Harpia harpyja Linnaeus, 1758) de cativeiro”**, sob responsabilidade de **Prof. Nei Moreira**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi **aprovado** pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA), em 27/05/2013.

Este parecer não exime o pesquisador da necessidade de obtenção de autorização do órgão ambiental competente de nível municipal, estadual e/ou federal.

Palotina, 28 de maio de 2013.

Profª Erica Cristina Bueno do Prado Guirro  
CEUA - Campus Palotina – UFPR

Profª Dra Erica Cristina B. P. Guirro  
CRMV-PR 7.403  
SIAD 190.462  
UFPR – Campus Palotina

*Dedico este trabalho às aves de rapina,  
que serviram como fonte de inspiração  
e dedicação na minha vida acadêmica  
e científica.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, agradeço por todas as oportunidades e pessoas que colocou em meu caminho.

Ao orientador e amigo, Prof. Dr. Nei Moreira por ter aceitado e orientado este trabalho, e por todos os ensinamentos e oportunidades prestadas.

À Itaipu Binacional, pela autorização da realização deste trabalho e apoio financeiro na compra dos anticorpos e enzimas para a realização das análises imunoenzimáticas.

À equipe técnica do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional, em especial aos Amigos Wanderlei de Moraes, Zalmir Silvino Cubas e Marcos José de Oliveira por todo o apoio, confiança depositada, ensinamentos e por todo o trabalho que exercem no manejo e reprodução da espécie.

À equipe de tratadores do Refúgio Biológico Bela Vista, por toda a ajuda durante as coletas e pelo trabalho fundamental prestado com os animais.

À CAPES, pela bolsa de pós-graduação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Paraná, cujo ensinamento e oportunidade foram extremamente enriquecedores.

A toda a equipe do Programa de Pós-Graduação em Zoologia, pelo apoio e dúvidas sanadas.

Ao amigo Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira, na prática meu co-orientador neste trabalho. Por toda a confiança depositada, por todo o ensinamento e ajuda prestada durante este trabalho, por permitir o uso do Laboratório para a extração e análise das amostras e, pelo exemplo e dedicação na conservação das aves.

A todos os membros do GEMA, Bruno Rui, Fabio Chianina Shibuya, Daniel De Biase e Mayra Frediani e aos funcionários e professores do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, pelo apoio durante minha passagem por São Paulo.

Ao Prof. Dr. Marcilio Nichi, pela orientação na análise estatística.

À Dra. Priscila Viau Furtado, pela ajuda e por permitir o uso do Laboratório de Dosagem Hormonais da USP para a liofilização das amostras.

A todos os membros da banca, por poder contar com suas presenças e por suas valorosas contribuições.

A minha família, principalmente a minha mãe Clarice Noeli Blank por toda a dedicação e carinho e aos meus irmãos, Mirlei Edimara Blank, Carlos Alexandre Blank e Marlos Eduardo Blank pelo apoio.

A todos os meus amigos que contribuíram de alguma forma durante o presente trabalho, obrigado por todo apoio, acalento, conselhos e discussões geradas em torno deste trabalho.

E por fim agradeço aos gaviões-reais utilizados neste estudo, aves maravilhosas com as quais tive a oportunidade de trabalhar.



*“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados”*

Mahatma Gandhi

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. CAPÍTULO 1 – Considerações gerais .....</b>	<b>19</b>
1.1 Introdução .....	19
1.2 Objetivos .....	20
1.3 Espécie do estudo: Gavião-real ( <i>Harpia harpyja</i> , Linnaeus, 1758) .....	20
1.4 Referências .....	27
<b>2. CAPÍTULO 2 – Biologia reprodutiva e técnicas de reprodução assistida em aves de rapina .....</b>	<b>30</b>
2.1. Introdução .....	32
2.2. Sistema reprodutor de fêmeas .....	33
2.2.1 <i>Fisiologia reprodutiva feminina em rapinantes: desenvolvimento folicular, ovulação e oviposição</i> .....	35
2.3 Sistema reprodutor masculino.....	38
2.3.1 <i>Fisiologia reprodutiva masculina em rapinantes: espermatogênese e produção de sêmen</i> .....	38
2.4 Sazonalidade reprodutiva.....	40
2.5 Técnicas de reprodução assistida empregadas em rapinantes .....	42
2.5.1 <i>Análise endócrina em aves de rapina</i> .....	42
2.5.2 <i>Técnicas de coleta de sêmen em aves de rapina</i> .....	43
2.5.4 <i>Inseminação artificial em aves de rapina</i> .....	48
2.6 Referências .....	52

<b>3. CAPÍTULO 3 – Perfil anual de andrógenos em machos de gavião-real (<i>Harpia harpyja</i>) e sua correlação com comportamento reprodutivo e fatores ambientais na região sul do Brasil.</b>	<b>56</b>
3.1 Introdução	60
3.2 Material e Métodos	62
3.2.1 Área de estudo	62
3.2.2 Animais e Recintos	63
3.2.3 Coleta de Dados: Meteorológicos, Comportamental e de Amostras Fecais	66
3.2.4 Dados Comportamentais	67
3.2.5 Extração Fecal e Ensaio Imunoenzimático	68
3.2.6 Análise Estatística	69
3.3 Resultados	70
3.4 Discussão	83
3.5 Referências	91
<b>ANEXOS</b>	<b>96</b>



## LISTA DE FIGURAS

### 1. Considerações gerais

- Figura 1.1** - Exemplares adultos de gavião-real (*Harpia harpyja*): A - indivíduo predando uma preguiça-real (*Choloepus didactylus*), em Candeias do Jamari, Rondônia – Brasil; B – indivíduo predando um bugio (*Alouatta macconnelli*), Kabalebo – Suriname. Fonte: Danilo Mota e Rienus Van Der Wal. .... 22
- Figura 1.2** - Registro de um gavião-real (*H. harpyja*) adulto, no Parque Estadual do Turvo – Rio Grande do Sul. Fonte: Dante Meller, 2015..... 23
- Figura 1.3** – A - Cocar indígena ornamentado com penas de gavião-real; B - indivíduo juvenil abatido em julho de 2010 no interior do Mato Grosso após atacar um frango. Fonte: João Marcos Rosa e Christopher Borges..... 24

### 2. Biologia reprodutiva e técnicas de reprodução assistida em aves de rapina

- Figura 2.1** - Coleta de sêmen cooperativa em falcão-gerifalte (*Falco rusticolus*) utilizando um chapéu coletor. Fonte: Juergen Kramer ..... 44
- Figura 2.2** - Coleta de sêmen em gavião-real (*Harpia harpyja*) pelo método da massagem. A - contenção do macho e; B - estimulação cloacal e coleta de sêmen com o auxílio de um capilar. Fonte: O autor, método realizado no CASIB – Foz do Iguaçu, Paraná. .... 46
- Figura 2.3** – Coleta de sêmen em gavião-pega-macaco (*Spizaetus tyrannus*) pelo método da eletroejaculação realizada na Fundação Zoológico de São Paulo. A – contenção do macho previamente ao procedimento; B – estimulação cloacal através do transdutor retal e C – microscopia com aumento de 100x de um espermatozoide normal de gavião-de-penacho (*Spizaetus ornatus*), a =



região do acrossoma, b = cabeça filiforme, c = peça intermediária e d = cauda do espermatozoide..... 47

### **3. Perfil anual de andrógenos em machos de gavião-real (*Harpia harpyja*) e suas correlações com diferentes comportamentos reprodutivos e fatores ambientais na região sul do Brasil**

**Figura 3.1** - Local do estudo, Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), animais e estrutura dos recintos. A – Macho adulto de gavião-real (*Harpia harpyja*), ao fundo observa-se a fêmea e ninho; B – Vista geral do bloco de três recintos, em detalhe o corredor de segurança e janelas de manejo do ninho; C – Vista interna do recinto, observar a ambientação dos poleiros, tanque e área de cambiamento ao fundo; D – Vista do fundo do cambiamento, observar a altura e posição do ninho sobre o abrigo. Imagem A – Fonte: o autor; Imagens B, C e D – Fonte: Marcos José de Oliveira. .... 65

**Figura 3.2** - Dados climáticos (temperatura, fotoperíodo e precipitação semanal média) da cidade de Foz do Iguaçu de setembro de 2013 a dezembro de 2014. .... 72

**Figura 3.3** - Perfil sazonal da secreção de andrógenos fecais e comportamentos reprodutivos (atividade no ninho e cópulas): Setas preenchidas indicam a data da postura de ovos férteis e setas não preenchidas indicam a data da postura de ovos inférteis. Os gráficos estão dispostos individualmente (Machos 1, 2 e 3, respectivamente). .... 77

**Figura 3.4** - Variação sazonal de comportamentos reprodutivos (fornecimento de alimento do macho para a fêmea, aproximação do casal e tempo de



## Lista de figuras

---

permanência do macho no ninho) em machos de gavião-real (*H. harpyja*). Cada gráfico representa um animal (Machos 1, 2 e 3, respectivamente). ..... 78

**Figura 3.5** - Média ( $\pm$ EPM) dos níveis de andrógenos fecais de machos reprodutores de gavião-real (*Harpia harpyja*) classificados de acordo com a época reprodutiva. Números acima das barras indicam o número de amostras analisadas. .... 79

**Figura 3.6** - Média ( $\pm$ EPM) dos níveis de andrógenos fecais de machos de gavião-real (*Harpia harpyja*) classificados entre, machos reprodutores e não reprodutores. Números acima das barras indicam o número de amostras analisadas. .... 79

**Figura 3.7** - Número de amostras por intervalo de níveis de andrógenos fecais de machos de gavião-real (*Harpia harpyja*) classificadas conforme época reprodutiva. .... 80



## LISTA DE TABELAS

### 1. Considerações gerais

**Tabela 1.1.** Lista de instituições que apresentaram sucesso na reprodução do gavião-real (*Harpia harpyja*) entre os anos de 1981 a 2014. .... 25

### 3. Perfil anual de andrógenos em machos de gavião-real (*Harpia harpyja*) e suas correlações com diferentes comportamentos reprodutivos e fatores ambientais na região sul do Brasil

**Tabela 3.1.** Dados dos machos de gavião-real (*Harpia harpyja*) utilizados no projeto. .... 63

**Tabela 3.2.** Atividade reprodutiva dos casais de gavião-real (*Harpia harpyja*) durante o estudo ..... 71

**Tabela 3.3.** Características reprodutivas de machos de gavião-real (*Harpia harpyja*). .... 81

**Tabela 3.4.** Correlações entre a concentração de andrógenos fecais (ng/g) com comportamento reprodutivo e fatores ambientais locais, em machos de gavião-real (*Harpia harpyja*)..... 82



## **LISTA DE ABREVIÇÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS**

AMH = hormônio anti-Mülleriano

°C = graus Celsius

CASIB = Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional

CITES = *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção)

cm = centímetros

CRAX = Fundação Crax Brasil

E<sub>2</sub> = Estrógeno

EIA = enzimoimunoensaio

EPM = erro padrão da média

FSH = hormônio folículo estimulante

g = gramas

GnIH = hormônio inibidor de gonadotropinas

GnRH = hormônio liberador de gonadotropinas

h = horas

IA = inseminação artificial

IUCN = *International Union for Conservation of Nature* (União Internacional para a Conservação da Natureza)

Kg = quilogramas

LH = hormônio luteinizante

m = metros

m<sup>2</sup> = metros quadrados

m<sup>3</sup> = metros cúbicos

mL = mililitros

mm = milímetros





### *Lista de abreviações, símbolos e siglas*

---

min = minutos

ng/g = nanogramas por grama

PPGZOO = Programa de Pós-Graduação em Zoologia

RE  $\alpha$  = receptores nucleares alfa

$\mu$ L = microlitros



## RESUMO GERAL

A região Neotropical acumula o maior número de espécies de acipitrídeos do mundo. Além da importância em termos de biodiversidade, a região abriga aves de rapina de grande valor em estratégias conservacionistas, tanto pelo interesse que despertam no público, quanto pela sua importância ecológica na manutenção da qualidade do habitat. Dessa forma, podemos citar algumas espécies prioritárias na elaboração de ações conservacionistas (*Harpia harpyja*, *Leptodon forbesi*, *Urubitinga coronata*, *Amadonastur lacernulatus*, *Circus cinereus* e *Morphnus guianensis*), pelo fato de estarem classificadas como ameaçadas de extinção segundo o IBAMA. Embora, a prioridade seja sempre proteger as espécies em seu habitat natural, a reprodução em cativeiro tem desempenhado um papel fundamental na conservação, recuperação e manutenção de determinadas espécies. Assim, para a criação e manutenção de um banco genético em cativeiro devemos, urgentemente, estabelecer casais aptos a participar de programas de reprodução, aumentar a eficiência reprodutiva e diminuir as taxas de mortalidade neonatal em espécies de rapinantes que apresentam dificuldade de reproduzir em cativeiro. De acordo com estas considerações, este trabalho visou, especialmente, contribuir para esse objetivo, fornecendo no primeiro capítulo informações sobre morfologia, dieta, distribuição, conservação e histórico reprodutivo em cativeiro do gavião-real (*Harpia harpyja*). O segundo capítulo fornece noções básicas sobre a anatomia e fisiologia reprodutiva de aves de rapina, como também descreve algumas técnicas de reprodução assistida comumente empregadas na reprodução *ex situ* do grupo, para que possamos compreender os diversos mecanismos reguladores na reprodução e as principais ferramentas de auxílio na reprodução em cativeiro. E, finalmente, o terceiro capítulo tem como objetivo descrever o perfil de andrógenos fecais em machos de gavião-real, correlacionando com dados comportamentais e ambientais, como uma forma de auxiliar o manejo reprodutivo através da identificação de machos que possam ser utilizados em programas de reprodução.

**Palavras-chave:** Gavião-real, reprodução em cativeiro, andrógenos, conservação, aves de rapina.



## **GENERAL ABSTRACT**

The Neotropical region accumulates the highest number of Accipitridae in the world. Besides the importance in terms of biodiversity, the region is home to valuable birds of prey, which are focus of conservation strategies, yonder the interest they inspire in the public, as for their ecological importance in habitat maintenance. We can cite a few priority species in the development of conservation actions (*Harpia hapyja*, *Leptodon forbesi*, *Urubitinga coronata*, *Amadonastur lacernulatus*, *Circus cinereus* and *Morphnus guianensis*) because these species are included in the Brazilian official list of threatened species, organized by IBAMA. Although the priority is always to protect the species in the natural habitat, captive breeding has assumed a key role in conservation, restoration and maintenance of determined species. For the creation and maintenance of a genomic resource bank in captivity we have to, urgently, establish pairs able to participate in captivity breeding programs, increase reproductive efficiency and reduce neonatal mortality. By this way, this dissertation especial seeks to contribute for this goal. The first chapter brings information compiled on morphology, diet, distribution, conservation and captivity breeding status in harpy eagle. The second chapter provides the basic information in anatomy and physiology, but also describes some reproduction techniques commonly employed in the group. Finally, the third chapter aims to describe the profile of fecal androgens in males of harpy eagle correlated with behavior and environment, as a way to assist reproduction management by selecting males that can be used in breeding programs.

**Keywords:** Harpy eagle, captivity breeding, androgens, conservation, birds of prey



## 1. CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### 1.1 Introdução

Um dos desafios globais que a humanidade tem que enfrentar é a perda maciça da biodiversidade. Em 2013, a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) relatou que, aproximadamente, 13% de todas as 9.930 espécies de aves existentes no mundo estavam ameaçadas de extinção, e estimativas indicam que este número continuará a crescer nos próximos anos (*Birdlife International*, 2013). Embora a prioridade seja sempre proteger as espécies em seu habitat natural, a reprodução em cativeiro desempenha um papel fundamental na conservação, recuperação e manutenção de determinadas espécies. Por exemplo, o sucesso na recuperação das populações selvagens de falcão-peregrino (*Falco peregrinus*), condor-da-Califórnia (*Gymnogyps californianus*) e águia-careca (*Haliaeetus leucocephalus*) demonstram a importância do manejo *ex situ* e a utilização de técnicas de reprodução assistida em aves de rapina (Saint-Jalme, 2002; Blanco et al., 2009). No entanto, o sucesso desses programas está diretamente relacionado ao avanço no conhecimento sobre a biologia reprodutiva das diferentes espécies, possibilitando que estoques genéticos possam ser produzidos através do aumento das populações cativas ou através da criopreservação de seus gametas. Assim, estudos que possam melhorar o desempenho reprodutivo de espécies ameaçadas devem ser realizados, contribuindo tanto na criação e manutenção de um banco de reserva genética em cativeiro, como aumentando a eficiência reprodutiva de espécies que apresentam dificuldade de reproduzir em cativeiro (Pereira, 2008). Neste



## *Considerações gerais*

---

sentido, a utilização da endocrinologia tem contribuído com informações relevantes sobre o funcionamento do ciclo reprodutivo, suas interações com o ambiente e compreensão das atividades comportamentais reprodutivas. Através de uma abordagem menos invasiva, a mensuração de metabólitos esteroides reprodutivos pelas excretas tem se tornado uma das melhores ferramentas no estudo da fisiologia reprodutiva em rapinantes (Bercovitz et al., 1982; Pereira et al., 2010).

### **1.2 Objetivos**

O objetivo do presente trabalho foi fornecer informações sobre a fisiologia reprodutiva de machos de gavião-real (*Harpia harpyja*) criados em cativeiro e avaliar sua relação com diferentes comportamentos reprodutivos e fatores ambientais locais. Além disso, definir um padrão de secreção de esteroides sexuais, através da análise de excretas, durante as quatro estações do ano e validar o ensaio imunoenzimático (EIA, ensaio imunoenzimático) para a dosagem de andrógenos em excretas. Dessa forma, esperamos por meio deste trabalho, ampliar o conhecimento sobre a biologia reprodutiva, e fornecer informações relevantes para o manejo reprodutivo dessa espécie.

### **1.3 Espécie do estudo: Gavião-real (*Harpia harpyja*, Linnaeus, 1758)**

O gavião-real (*Harpia harpyja*) é o maior representante da família Accipitridae na região neotropical e a única espécie descrita pertencente ao gênero *Harpia*. Juntamente com o gavião-real-falso ou uiraçu-falso (*Morphnus guianensis*) são os dois únicos representantes da subfamília Harpiinae na região neotropical, sendo que os demais representantes são a águia-filipina



### *Considerações gerais*

---

(*Pithecophaga jeffreyi*) e a harpia-da-Nova-Guiné (*Harpyopsis novaguineae*), ambas encontradas no Velho Mundo.

A *H. harpyja* possui entre 65 a 105 cm de altura, sendo que as fêmeas, predominantemente maiores, podem atingir envergadura superior a 2m e pesar aproximadamente 9 kg (Ferguson-Lees; Christie 2001). O gavião-real possui, como principais características físicas, um longo topete, a crista com duas penas maiores, sua cabeça é cinza, o papo e a nuca negros e o peito, o ventre e a parte interna das asas, brancos. Sendo uma espécie extremamente adaptada a ambientes florestais, possui asas largas e redondas e uma cauda relativamente longa, que pode medir até 2/3 do comprimento da asa. Considerada a ave de rapina mais poderosa do mundo, apresenta pernas curtas e grossas, e dedos extremamente fortes, com enormes garras, especialmente as do hálux que podem atingir 8 cm (Sick, 1997; Sigrist, 2009).

Devido à diferença de tamanho entre os sexos, as presas normalmente predadas diferem por gênero, sendo que, a base da alimentação é constituída principalmente por mamíferos arborícolas, como preguiças e primatas (Figura 1.1); e terrestres, como veados, quatis, pacas, cutias, tatus e outros. Galletti e Carvalho-Junior (2000) realizaram coletas durante um período de 15 meses sob o ninho de gavião-real e encontraram 21 crânios, sendo 20 pertencentes a duas espécies de preguiças (55% de *Choloepus didactylus* e 45% de *Bradypus variegatus*), o outro crânio foi descrito como pertencente a um marsupial (*Philander opossum*). Outros trabalhos apontaram a preguiça como a principal presa, chegando a 36% de sua dieta na Guiana (Retting, 1978) e 78% no



### *Considerações gerais*

médio Amazonas (Aguiar-Silva et al., 2014). Também capturam répteis e outras aves, como seriemas, araras e mutuns (Mikich e Bérnils, 2004).



**Figura 1.1** - Exemplos adultos de gavião-real (*Harpia harpyja*): A - indivíduo predando uma preguiça-real (*Choloepus didactylus*), em Candeias do Jamari, Rondônia – Brasil; B – indivíduo predando um bugio (*Alouatta macconnelli*), Kabalebo – Suriname. Fonte: Danilo Mota e Rienus Van Der Wal.

A distribuição da espécie ocorre de forma descontínua do sul do México ao norte da Argentina, habitando florestas primárias úmidas. No Brasil, possui registros históricos em quase todos os estados brasileiros, com exceção da maioria dos estados do nordeste e, atualmente, está presente nos seguintes biomas: Mata Atlântica (Albuquerque, 1995) Cerrado (Oliveira e Silva, 2006), Amazônia (Olmos et al., 2006) e Pantanal (Ubaid et al., 2011).

Apesar da ampla distribuição, a espécie é considerada quase ameaçada (*Birdlife International*, 2014; IUCN, 2014) e está listada no Anexo I (espécies ameaçadas de extinção) da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Selvagens (CITES). Extinções locais ocorreram em regiões extra-amazônicas, sendo que no estado do Rio Grande do Sul, a espécie era considerada extinta até recentemente



### *Considerações gerais*

---

(Soares et al., 2008). Entretanto, em maio de 2015 a espécie foi registrada no Parque Estadual do Turvo, um dos mais importantes fragmentos de mata atlântica da região sul do Brasil (Figura 1.2).



**Figura 1.2** - Registro de um gavião-real (*H. harpyja*) adulto, no Parque Estadual do Turvo – Rio Grande do Sul. Fonte: Dante Meller, 2015.

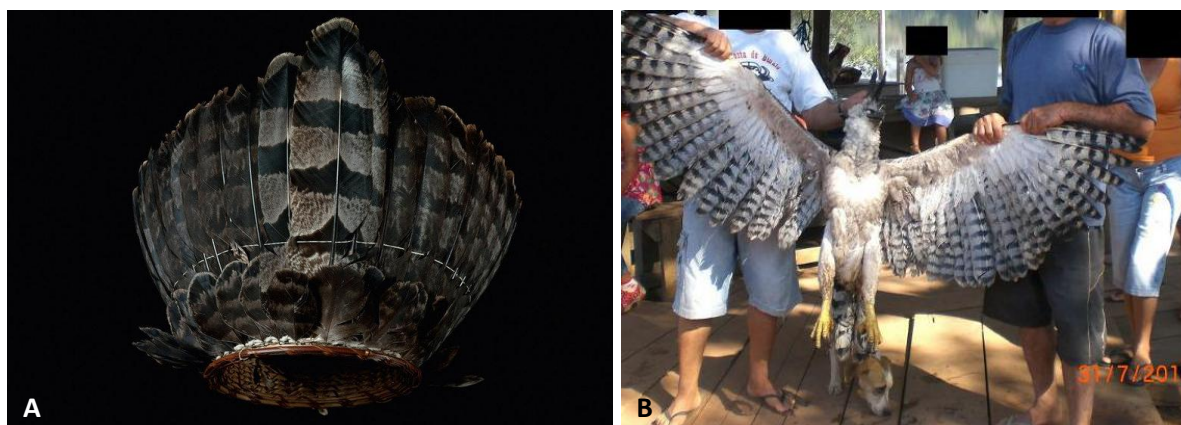
Dentre as ameaças para a espécie, o desmatamento, perda e fragmentação do habitat, são as principais causas do desaparecimento em boa parte da área de ocorrência. A necessidade de manter áreas bem preservadas que contenham diversidade e abundância de presas, em especial espécies de mamíferos arborícolas, além de árvores emergentes utilizadas para nidificação são medidas cruciais para a preservação da espécie (Aguiar-Silva et al., 2014). Outras ameaças estão relacionadas à caça como troféu. Devido ao seu grande porte e imponência, a espécie sempre foi cobiçada por caçadores e indígenas (Trinca et al., 2008). Em aldeias na região do Xingu, indivíduos eram mantidos em gaiolas desde filhotes para serem retiradas penas para ornamentos (Figura 1.3). Em outras tribos, é mantida como propriedade do cacique e, quando o cacique morre, a ave também é morta ou enterrada viva juntamente com seu





### *Considerações gerais*

dono (Sick, 1997). A espécie pode servir de alimento na região amazônica e nordeste do Maranhão (Freitas et al., 2014). Entretanto, as maiores causas de abate continuam sendo por temor a ataques a animais de criação (Figura 1.3), principalmente galinhas e patos (Mikich e Bérnils, 2004).



**Figura 1.3** – A - Cocar indígena ornamentado com penas de gavião-real; B - indivíduo juvenil abatido em julho de 2010 no interior do Mato Grosso após atacar um frango. Fonte: João Marcos Rosa e Christopher Borges.

Juntamente com os fatores acima destacados, a espécie apresenta lentas taxas de reprodução, com dois ou mais anos entre os períodos, sendo considerado um dos mais longos períodos de reprodução entre as aves de rapina, tornando naturalmente lenta a recuperação das populações (Piana, 2007; Lerner et al., 2009). Em cativeiro, a reprodução da espécie é débil, sendo que nos últimos 34 anos poucas foram as instituições que obtiveram sucesso na reprodução do gavião-real, ou seja, alcançaram o nascimento seguido do completo desenvolvimento do filhote. E as poucas instituições que reproduziram, alcançaram números significativos de filhotes através de poucos casais formadores (Tabela 1.1).

*Considerações gerais***Tabela 1.1.** Lista de instituições que apresentaram sucesso na reprodução do gavião-real (*Harpia harpyja*) entre os anos de 1981 a 2014.

Instituições	Casais reprodutores	Número de filhotes	Criação Natural ou Artificial
CASIB <sup>1</sup>	1	16	Artificial
Cerefalco <sup>1</sup>	1	3	Artificial
CRAX – Brasil <sup>1</sup>	2	10	Natural/Artificial
Criadouro Tibagi <sup>1</sup>	1	1	Artificial
Criadouro Trópicus <sup>1</sup>	1	1	Artificial
Fazenda Itaóca <sup>1</sup>	1	3	Artificial
Parque Zoológico Itatiba <sup>1</sup>	1	1	Artificial
Zoológico de Berlim <sup>2</sup>	1	1	Natural
Zoológico de Guayaquil <sup>1</sup>	1	2	Natural
Zoológico de Miami <sup>1</sup>	1	3	Natural
Zoológico de San Diego <sup>1</sup>	1	15	Artificial
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>56</b>	<b>Natural = 12 / Artificial = 45</b>

<sup>1</sup> Dados obtidos através de questionário encaminhado para a instituição<sup>2</sup> Dados obtidos através de referência bibliográfica (Minnemann, 1984)



### Considerações gerais

---

Outro fator importante a ser considerado é o baixo número de filhotes criados naturalmente pelos pais (Tabela 1.1). A criação artificial pode ser mais produtiva em termos de número e sobrevivência de filhotes reproduzidos. Porém, falhas durante o manejo podem gerar problemas de *imprinting* com o ser humano e, indivíduos “imprintados” podem apresentar dificuldade para reproduzir naturalmente, rejeitando parceiros da própria espécie (Mendelssohn; Marder, 1970; Sapage, 2011). Portanto, a realização de estudos relacionados a aspectos fisiológicos e comportamentais faz-se necessária para a manutenção da espécie em cativeiro, podendo auxiliar tanto no conhecimento da biologia reprodutiva básica da espécie, quanto no manejo reprodutivo.



#### 1.4 Referências

- ALBUQUERQUE, J. L. B. Observations of rare raptors in southern Atlantic rainforest of Brazil. **Journal of Field Ornithology**, v. 66 p. 363-369, 1995.
- AGUIAR-SILVA, F. H.; SANAIOTTI, T. M.; LUZ, B. B. Food habits of the Harpy Eagle, a top predator from the Amazonian rainforest canopy. **The Journal of Raptors Research**, v. 48, p. 24-35, 2014.
- BERCOVITZ, A. B.; COLLINS, J.; PRICE, P.; TUTTLE, D. Noninvasive assessment of seasonal hormone profile in captive bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). **Zoo Biology**, v.1 p. 111-117, 1982.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Saving the world's most threatened birds: the BirdLife Preventing Extinctions Program**. Cambridge, 2013.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Species factsheet: *Harpia harpyja***. Disponível em [www.birdlife.org](http://www.birdlife.org). Acesso em 5 de dez de 2014.
- BLANCO, J. M.; WILDT, D. E.; HÖFLE, U.; VOELKER, W.; DONOGHUE, A. M. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. **Theriogenology**, v.71 p. 200–213, 2009.
- FERGUSON-LEES, J., CHRISTIE, D. A. **Raptors of the world**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 1. ed. 320p, 2001.
- FREITAS, M. A.; LIMA, D. M.; GOMES, F. B. R. Registro de abate de gaviões-reais *Harpia harpyja* (Accipitridae) para consumo humano no Maranhão, Brasil. **Atualidades Ornitológicas** v. 178, p. 12-15, 2014.
- GALETTI, M.; CARVALHO J. R. Sloths in the diet of a Harpy Eagle nestling in Eastern Amazon. **Wilson Bull.** v. 112 p. 535-536, 2000.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. IUCN Red list of threatened species. Disponível em [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acesso em 5 de dez. 2014.
- LERNER, H. R. L.; JOHNSON, J. A.; LINDSAY, A. R.; KIFF, L. F. E MINDELL, D. P. It's not too late for the Harpy Eagle (*Harpia harpyja*): High levels of genetic diversity and differentiation can fuel conservation programs. **PLOS ONE**, v.4, n.10, p. 1-10, 2009.
- MENDELSSOHN, H.; MARDER, U. Problems of reproduction in birds of prey in captivity. **International Zoo Yearbook**, v. 6, p. 6-11, 1970.



MIKICH, S. B.; BÉRNILS, R. S. **Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná**. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná. 2004.

MINNEMANN, D. Breeding birds of prey at the East Berlin Zoo. **International Zoo Yearbook**, v. 23, p.102-108, 1984.

OLIVEIRA, A. L.; SILVA, R. S. Registro de Harpia (*Harpia harpyja*) no cerrado de Tapira, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.14 p. 433-434, 2006.

OLMOS, F.; PACHECO, J. F.; SILVEIRA, L. F. Notas sobre aves de rapina (Cathartidae, Accipitridae e Falconidae) brasileiras. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.14 p.401-404, 2006.

PEREIRA, R. J. G. **Acompanhamento endócrino e comportamental da atividade reprodutiva anual de machos de falcões quiri-quiri (*Falco sparverius*) de vida livre**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo. 84p. 2008.

PEREIRA, R. J. G.; GRANZINOLLI, M. A. M.; DUARTE, J. M. B. Annual profile of fecal androgen and glucocorticoid levels in free-living male American kestrels from southern mid-latitude areas. **General and Comparative Endocrinology**, v.166 p. 94-103, 2010.

PIANA, R. P. Nesting and diet of *Harpia harpyja* Linnaeus in the native Community of Infierno, Madre de Dios, Peru. **Revista Peruana de Biología**, v.14 p. 135–138, 2007.

RETTIG, N. L. Breeding behavior of the harpy eagle (*Harpia harpyja*). **Auk**, v.95 p. 629-643, 1978.

SAINT-JALME, M. Endangered avian species propagation: an overview of functions and techniques. International Congress on Bird Reproduction, special issue. **Avian Poult Biol Rev**, v. 13 p. 87–203, 2002.

SAPAGE, M. A. P. **Comportamento reprodutor de rapinas diurnas na coudelaria Alter Real e em Vaiamonte**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, Portugal. 45p, 2011.

SICK H. Ornitologia Brasileira. Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira, 912p, 1997.

SIGRIST, T. **Avifauna Brasileira**, São Paulo, Editora Avis Brasilis, 600p, 2009.

SOARES, E. S.; AMARAL, F. S. R.; CARVALHO FILHO, E. P. M.; GRANZINOLLI, M. A.; ALBUQUERQUE, J. L. B.; LISBOA, J. S.; AZEVEDO, M.



### Considerações gerais

---

A. G.; MORAES, W.; SANAIOTTI, T.; GUIMARÃES, I. G.; CARVALHO, C. E. A. E ZORZIN, G. **Plano de Ação Nacional para a Conservação de Aves de Rapina**. Brasília, Editora Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). 136p, 2008.

TRINCA, C. T.; FERRARI, S. F. E; LEES, A. C. Curiosity killed the bird: arbitrary hunting of Harpy Eagles *Harpia harpyja* on an agricultural frontier in southern Brazilian Amazonia. **Cotinga**, v. 30, p. 12-15, 2007.

UBAID, F. K.; FERREIRA, L. P.; OLIVEIRA-JUNIOR, S. B.; ANTAS, P. T. Z. Primeiro registro de *Harpia harpyja* para o bioma Pantanal, com dados sobre atividade reprodutiva. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.19 p.88-92, 2011.



## 2. **CAPÍTULO 2 – <sup>1</sup>Biologia reprodutiva e técnicas de reprodução assistida em aves de rapina.**

Resumo: As aves de rapina são representadas por aproximadamente 563 espécies divididas em dois grandes grupos; os rapinantes diurnos e os rapinantes noturnos, os quais somados correspondem a aproximadamente 6% de todas as aves do mundo. Entretanto, mesmo com a atual representatividade, o conhecimento sobre a biologia reprodutiva do grupo é limitado. Essa escassez de conhecimento não só atua como fator limitante para a compreensão da ecologia reprodutiva das aves de rapina em vida livre, como também limita a ação de programas de conservação. A reprodução em cativeiro tem desempenhado um papel fundamental na conservação de rapinantes. Por exemplo, o sucesso na recuperação das populações selvagens de falcão-peregrino (*Falco peregrinus*) e condor-da-Califórnia (*Gymnogyps californianus*) demonstra a importância do manejo *ex situ* e a utilização de técnicas de reprodução assistida em aves de rapina. Sendo assim, esta revisão teve por objetivo fornecer informações sobre a anatomia e fisiologia reprodutiva, como também trazer informações sobre a sazonalidade reprodutiva e técnicas de reprodução assistida comumente empregadas na reprodução *ex situ* de aves de rapina.

**Palavras-chave:** Aves de rapina, rapinantes, reprodução em cativeiro, reprodução e conservação.



## **CHAPTER 2 - Reproductive biology and assisted reproduction techniques in birds of prey**

Abstract: Birds of prey are represented by 563 species divided into two major groups; the diurnal and nocturnal raptors, corresponding to 6% of all birds in the world. However, even with the current representation, knowledge about the reproductive biology of the group is limited. This lack of knowledge not only acts as a limiting factor for the comprehension of the reproductive ecology of wild raptors, but also limits the action of conservation programs. The reproduction of captive birds of prey has played a key role in the conservation this group. For example, the successful recovery of wild population of peregrine falcon (*Falco peregrinus*) and Californian condor (*Gymnogyps californianus*) demonstrates the importance of *ex situ* management and the use of assisted reproduction techniques in raptors. Therefore this review aimed to supply information about anatomy and reproduction physiology, as well as to provide information about reproductive seasonality and assisted reproduction techniques (ARTs) commonly employed in captive birds of prey.

**Keywords:** Birds of prey, raptors, captive breeding, reproduction, conservation.





## 2.1. Introdução

A reprodução das aves de rapina apresenta uma grande diversidade de padrões, pois se trata de um grupo de aves taxonomicamente distinto e que apresenta diferenças anatômicas, fisiológicas e comportamentais bem marcantes. Atualmente, as aves de rapina são divididas em dois grandes grupos; as aves de rapina diurnas que inclui as ordens Falconiformes (famílias Falconidae, Accipitridae, Pandionidae e Sagittariidae) e Cathartiformes (família Cathartidae), e as aves de rapina noturnas que pertencem à ordem Strigiformes (famílias Tytonidae e Strigidae) (Ferguson-Lees; Christie, 2001; König et al., 2009).

Embora a criação de rapinantes em cativeiro seja uma atividade praticada há muito tempo, o primeiro registro de reprodução só foi documentado no início da década de 40, sendo que os primeiros dados consistentes sobre o ciclo reprodutivo de rapinantes foram obtidos somente no final dos anos 60 com as espécies de falcões quiri-quiri (*Falco sparverius*) e peneireiro (*Falco tinnunculus*) (Cade et al., 1977). Entretanto, o atual conhecimento sobre a biologia reprodutiva do grupo ainda é baseado principalmente nas espécies utilizadas na falcoaria. Informações básicas, tais como maturidade sexual, características do ejaculado, ovulação, fertilização e oviposição são desconhecidas para a maioria das espécies em vida livre (Blanco et al., 2007). Esta escassez de conhecimento não só atua como um fator limitante para a melhoria do sucesso reprodutivo em programas de reprodução em cativeiro, como também torna mais difícil a compreensão da ecologia reprodutiva das aves de rapina (Blanco et al., 2007).



Uma maneira de suprir parcialmente esta carência de informações é aliar os conhecimentos provenientes de décadas de estudo em aves domésticas (exemplo: galinhas, perus, codornas, perdizes etc.). Essa integração tem gerado subsídios para o desenvolvimento de novos métodos e, por conseguinte, contribuído na reprodução de espécies ameaçadas (Pereira, 2014). Entretanto, o uso de algumas biotécnicas que, comumente, são empregadas na conservação de mamíferos ainda é um desafio na reprodução de aves, tais como a criopreservação de oócitos e embriões, devido à dificuldade em acessar o oócito e o embrião pela grande quantidade de vitelo presente no ovo (Blesbois et al., 2007; Rutz et al., 2007). Porém, o desenvolvimento de técnicas ligadas à inseminação artificial e de criopreservação de sêmen é uma realidade na conservação de rapinantes e já vêm sendo utilizadas com sucesso há algum tempo (Blanco et al., 2009). Dessa forma, esta revisão teve por objetivo fornecer informações básicas sobre a anatomia, fisiologia e comportamento para que possamos compreender os diversos mecanismos reguladores da atividade reprodutiva e, por conseguinte, contribuir na conservação do grupo. Além de compilar e discutir as informações existentes na literatura sobre as diversas técnicas de reprodução assistida empregada em aves de rapina.

## **2.2. Sistema reprodutor de fêmeas**

O sistema reprodutor feminino nas aves é único por apresentar um desenvolvimento gonadal unilateral (apenas o lado esquerdo), ou seja, é composto por apenas um ovário e oviduto funcionais. Uma das explicações para que o oviduto e ovário esquerdo não sofram regressão é por



apresentarem maior número de receptores nucleares  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) que se ligam ao estrógeno (E<sub>2</sub>) criando um complexo molecular E<sub>2</sub>-RE $\alpha$  que inibe a ação do hormônio anti-Mülleriano (AMH; Ishimaru et al., 2008). Entretanto, em certas aves de rapina a fêmea pode apresentar ovário e oviduto direitos além do esquerdo, sendo que, os órgãos destros são encontrados em menor tamanho e aparentemente não são funcionais. Essas características foram documentadas para os gêneros *Accipiter*, *Circus*, *Falco*, *Buteo* e *Aquila* (Hirschberg, 2008). Em rapinantes noturnos, o ovário direito é completamente ausente (Smith, 2007). O ovário funcional dos rapinantes é ligado à parede celomática dorsal, localizando-se próximo da glândula adrenal, medial à divisão cranial do rim ipsilateral e mantém contato com o saco de ar abdominal (Hirschberg, 2008). Diferentemente dos ovários em mamíferos, onde grande parte dos folículos em desenvolvimento permanece no córtex ovariano, nas aves os folículos acima do estágio primordial de desenvolvimento projetam-se do estroma ovariano como uvas em um cacho, denominado pedúnculo folicular (Hirschberg, 2008). O oviduto das espécies de rapinantes é muito semelhante com o descrito para outras aves. Este órgão consiste em cinco regiões funcionais distintas: o infundíbulo, magno, istmo, útero (glândula da casca) e vagina. Uma particularidade encontrada na junção útero-vaginal das aves é a presença das glândulas hospedeiras de espermatozoides, cuja principal função é o armazenamento de espermatozoides, no entanto, a presença destas glândulas é pouco documentada em rapinantes (Bakst; Bird, 1987; Blanco et al., 2007).



### *2.2.1 Fisiologia reprodutiva feminina em rapinantes: desenvolvimento folicular, ovulação e oviposição*

A atividade reprodutiva nas aves de rapina assim como nos demais grupos de aves é controlada pelo sistema hipotálamo pituitária (HPS). Este sistema funciona como um elaborado transdutor nervoso onde informações internas (níveis endócrinos, ovulação, oviposição, etc.) e externas (fotoperíodo, temperatura, alimento, etc.) são retransmitidas na forma de sinais neuroendócrinos e endócrinos que irão estimular a fase de início ou repouso reprodutivo (Ubuka; Bentley, 2011). Dessa forma, podemos citar dois hormônios peptídicos hipotalâmicos muito importantes na estimulação (GnRH-I) e na inibição (GnIH) da hipófise anterior das fêmeas ao regular o nível de secreção dos hormônios gonadotróficos FSH e LH que, por conseguinte, regularão a atividade ovariana (desenvolvimento folicular, ovulação e oviposição) (Ubuka; Bentley, 2011).

Embora sua função não esteja completamente elucidada nas aves, acredita-se que o FSH estimule o desenvolvimento dos folículos primordiais e induza a produção de andrógenos e estrógenos pelas células da teca (Johnson; Woods, 2007). Com o aumento da concentração de estrógeno, o fígado inicia a síntese de vitelogenina (VTG) e lipoproteínas de baixa densidade que serão transportadas até o ovário e depositadas em folículos primordiais em desenvolvimento (Blanco et al., 2007). É importante lembrar que nas fases iniciais de desenvolvimento folicular, as células da granulosa são incapazes de sintetizar progesterona (Johnson; Woods, 2007). Entretanto, à medida que os folículos incorporam vitelo e se desenvolvem, alguns deles são selecionados a participar da hierarquia folicular e passam a se chamar folículos



hierárquicos ou pré-ovulatórios (Johnson; Woods, 2007). A partir deste momento em diante inicia-se o processo final de crescimento e diferenciação folicular, no qual um folículo adquire a habilidade de rapidamente acumular grandes quantidades de vitelo e de produzir progesterona pelas células da granulosa (Johnson; Woods, 2007). Esta fase ocorre durante os dias que precedem a ovulação, durando entre 5-14 dias em Falconidae e Accipitridae (falcões, águias, gaviões e abutres do Velho Mundo; Blanco et al., 2007) e aproximadamente 11 dias em Strigiformes (corujas; Johnson; Woods, 2007). Como resultado, folículos hierárquicos em crescimento, gradativamente aumentam sua produção de progesterona pelas células da granulosa, ao mesmo tempo em que diminuem sua secreção de andrógenos e estrógenos pelas células da teca (Johnson; Woods, 2007). Isto ocorre porque a camada granulosa de folículos hierárquicos deixa de ser predominantemente dependente de FSH para se tornar primariamente dependente de LH, essa ação ocorre devido ao aumento no número de receptores para LH e pela ação da inibina sobre a hipófise anterior, que inibe a secreção de FSH (Johnson; Woods, 2007; Rutz et al., 2007). Esta resposta crescente ao LH gera uma maior capacidade das células da granulosa em produzir progesterona, ação esta que atinge seu ponto máximo em folículos hierárquicos maduros (F<sub>1</sub>; Johnson; Woods, 2007). Porém, o ovário durante a fase de postura possui folículos em vários estágios de desenvolvimento. Tal circunstância propicia a ovulação consecutiva de vários oócitos em intervalos curtos de tempo (poucos dias), sendo o intervalo entre ovulações e o número de oócitos ovulados por estação reprodutiva variável dependente da espécie de rapinante. Em comparação, o intervalo entre as posturas em rapinantes selvagens pode ser



de dois a três dias em coruja-das-torres (*Tyto furcata*; Martin et al., 2011), de dois a três dias em gavião-da-Europa (*Accipiter nisus*; Newton, 1976) de três a cinco dias em águia-dourada (*Aquila chrysaetos*; McGahan, 1968), de cinco a seis dias em gavião-real (*Harpia harpyja*; Blank, dados não publicados), e de quatro a cinco dias em condor-andino (*Vultur gryphus*; Colwell, 2006).

Diferente dos mamíferos, a secreção de estrógenos não está diretamente envolvida na indução do pico de LH ou da ovulação (Pollock; Orosz, 2002). Esse papel é exercido pela progesterona, que ao alcançar níveis plasmáticos elevados induz um processo de *feedback* positivo estimulando a liberação de GnRH-I pelo hipotálamo e, conseqüentemente, induz um pico na secreção de LH pela hipófise anterior (Bronneberg et al., 2007; Johnson; Woods, 2007). No entanto, a habilidade da progesterona em induzir o pico de LH depende da exposição prévia do hipotálamo a certos níveis de estrógeno e progesterona (Pollock; Orosz, 2002). O pico de LH é o estímulo direto para que ocorra a ovulação. Após a ovulação, o folículo pós-ovulatório permanece ativo durante alguns dias secretando hormônios importantes na secreção de prolactina, que estimulará o comportamento de nidificação e incubação, sendo em seguida reabsorvido pelo ovário (Pollock; Orosz, 2002).

No infundíbulo o oócito é fecundado e a camada perivitelínica externa que reveste o oócito é formada (Reed-Junior et al., 2011). No magno, secreções de estrógeno e progesterona pelos folículos em diferentes estágios de desenvolvimento sintetizam a produção do albúmen (ou clara) através de proteínas liberadas pelas glândulas tubulares e células epiteliais (Jung et al., 2011). O istmo é responsável pela produção das membranas interna e externa da casca. No útero, ou glândula da casca, assim como o nome sugere, é a



região responsável pela mineralização do ovo e tem sua ação controlada pelos níveis de estrógeno, que atua na mobilização de cálcio dos ossos medulares para o útero (Reed-Junior et al., 2011; Jung et al., 2011). A última parte do oviduto é a vagina, que tem sua função compartilhada com o útero na contração e expulsão do ovo sob a influência dos hormônios prostaglandina e arginina vasotocina (Reed-Junior et al., 2011, Pereira, 2014).

## **2.3 Sistema reprodutor masculino**

O sistema reprodutor masculino nas aves em contraste com a maioria dos mamíferos permanece no seu local de origem embrionária, dentro da cavidade celomática dorsal ao lado da glândula suprarrenal e medial à divisão cranial do rim e é composto por testículos, epidídimo, ductos deferentes e estruturas copulatórias (falo) (Hirschberg, 2008). Outra característica peculiar nas aves é que não apresentam órgãos ou glândulas sexuais acessórias análogas àsquelas observadas em mamíferos como glândulas vesiculares, bulbouretrais ou próstata (Pereira, 2014).

### *2.3.1 Fisiologia reprodutiva masculina em rapinantes: espermatogênese e produção de sêmen*

Assim como nas fêmeas, onde a atividade ovariana é controlada pelo sistema hipotálamo pituitária (HPS), a atividade testicular e o início da espermatogênese são mediadas pela ação dos hormônios liberadores e inibidores de gonadotrofinas (GnRH-I e GnIH, respectivamente). Uma vez liberados no sistema porta-hipofisário, estes peptídeos hipotalâmicos irão estimular ou inibir a síntese e liberação de gonadotropinas (FSH e LH) pela



hipófise anterior sob a influência da concentração de melatonina (Ubuka; Bentley, 2011).

O hormônio luteinizante (LH) atua primariamente sobre o testículo endócrino estimulando a produção de andrógenos (principalmente testosterona e androstenediona) pelas células de Leydig, enquanto o hormônio folículo-estimulante (FSH) age concomitantemente com os andrógenos sobre as células de Sertoli e células germinativas primitivas (espermatogônias) promovendo a espermatogênese (Bentley et al., 2007). Além de ser essencial à espermatogênese, a secreção de andrógenos pelos testículos em machos adultos é responsável pelo desenvolvimento dos epidídimos, ductos deferentes e pela expressão de comportamentos reprodutivos como vocalização, territorialidade, corte, cópula, entre outros. Os níveis de testosterona também são importantes na regulação e liberação de LH por mecanismo de *feedback* negativo, no qual altos níveis de testosterona inibem a secreção de GnRH-I e consequentemente de LH (Bentley et al., 2007). Outros hormônios polipeptídicos importantes na regulação da espermatogênese são a inibina e a ativina, produzidas nas células de Sertoli, têm como função inibir e estimular a secreção de FSH pela hipófise anterior (Rutz et al., 2007).

O período de produção de sêmen em aves de rapina varia entre as espécies e indivíduos, mas geralmente dura cerca de três meses. Em comparação, o falcão-quiri-quiri (*Falco sparverius*) apresenta um período médio de produção espermática de 74 dias (Bird; Langüe, 1977), o falcão-peregrino (*Falco peregrinus*) de 95 dias (Hoolihan; Burnham, 1985) e algumas espécies de águias podem apresentar um período de até 110 dias (Blanco et al., 2007). Entretanto, em gavião-real (*Harpia harpyja*) foram observados períodos





prolongados de cópula (maiores que 120 dias) devido à retirada de ovos do ninho, o que ocasionou nova postura com ovos férteis (Blank, dados não publicados).

## **2.4 Sazonalidade reprodutiva**

A reprodução é um processo energeticamente muito custoso e a disponibilidade de alimento no ambiente é fundamental para alcançar o sucesso reprodutivo. Dessa forma, as aves evoluíram para utilizar uma grande variedade de alimentos na criação de seus filhotes, mas a disponibilidade destes recursos na natureza varia de acordo com a estação (Dawson et., 2001; Dawson; Sharp, 2007). Para superar estes problemas, várias espécies estabeleceram estações reprodutivas objetivando reproduzir em períodos do ano em que a disponibilidade de alimento é maior. Como resultado, as aves desenvolveram diferentes mecanismos comportamentais e fisiológicos capazes de prever as mudanças sazonais do ambiente e completar as devidas alterações fisiológicas e anatômicas. Isto possibilitou uma otimização do seu ciclo reprodutivo de acordo com a disponibilidade de alimento no ambiente (Dawson et., 2001; Kumar et al., 2010).

Neste contexto, o estímulo externo de maior influência na sazonalidade reprodutiva é o fotoperíodo (tempo de exposição à luz), sendo considerado o principal sinalizador entre a sincronização do sistema neuroendócrino reprodutivo com as condições ambientais favoráveis para a reprodução (Dawson; Sharp, 2007). Esta sincronização é dependente do relógio endógeno interno, que responde pela evolução do número de horas de luz por dia, e está relacionado ao núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo (Kumar et al.,



2010). Essa área do hipotálamo, localizada junto ao nervo óptico, recebe estímulos da retina que informam o organismo sobre a existência de luz. Na ausência da luz, o NSQ do hipotálamo é estimulado a secretar melatonina, neuro-hormônio responsável na inibição do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal devido ao seu efeito estimulatório sobre a síntese e liberação do GnIH pelo hipotálamo (Kang et al., 2007; Kang et al., 2010). Entretanto, com o aumento do fotoperíodo, a secreção de melatonina cai, diminuindo a ação do GnIH no hipotálamo e, concomitantemente, estimula a secreção de GnRH-I, que por sua vez induz o desenvolvimento gonadal e a atividade reprodutiva (Kang et al., 2010; Chowdhury et al., 2010).

A capacidade de resposta do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal ao número de horas luz/dia é conhecida como fotossensibilidade. E o término da atividade reprodutiva é desencadeado por um processo chamado fotorrefratariedade, no qual o sistema neuroendócrino deixa de responder aos estímulos causados pelo fotoperíodo, resultando na regressão gonadal pela diminuição da síntese de GnRH-I (Dawson et al., 2001). Como mencionado anteriormente, as aves apresentam uma capacidade de regredir e aumentar suas gônadas, esse processo é chamado de recrudescência gonadal. Em algumas espécies a diferença no peso das gônadas durante a fase de descanso reprodutivo e durante a estação reprodutiva pode ultrapassar 300 vezes (Dawson et al., 2001).

Em aves de rapina, a sazonalidade reprodutiva é bem evidenciada em espécies de clima temperado, onde a diferença da duração de horas luz durante as estações do ano varia circunstancialmente (Pereira et al., 2010). Contudo, ao compararmos as condições climáticas em climas tropicais



percebemos uma redução gradativa na amplitude e previsibilidade das variações estacionais (Hau, 2001). Dessa forma, esperaríamos que rapinantes de clima tropical se reproduzissem o ano todo, uma vez que os trópicos são regiões de clima favorável onde o alimento está disponível regularmente o ano todo. Entretanto, grande parte das aves tropicais apresenta uma forte sazonalidade reprodutiva. Diferindo-se das espécies de clima temperado apenas por apresentar uma estação reprodutiva prolongada e uma grande variedade interespecífica quanto à época do nascimento dos filhotes (Hau, 2001; Hau et al., 2008).

## **2.5 Técnicas de reprodução assistida empregadas em rapinantes**

### *2.5.1 Análise endócrina em aves de rapina*

Nas últimas décadas o monitoramento endócrino pela mensuração de metabólitos fecais tem se mostrado uma prática eficaz na investigação da atividade reprodutiva e do estresse em várias espécies de aves e mamíferos selvagens e domésticas (Touma; Palme, 2005). Entretanto, apesar das facilidades que esta técnica propicia na obtenção de amostras seriadas, alguns fatores devem ser considerados durante seu uso para que resultados confiáveis e conclusões apropriadas possam ser alcançados. Por exemplo, o metabolismo e a excreção dos hormônios esteroides apresenta uma variação intra e interespecífica e, por essa razão, todo monitoramento endócrino não invasivo deve ser previamente validado para cada espécie antes de sua aplicação (Goymann, 2005; Touma; Palme, 2005).

O processo de validação de um ensaio hormonal para monitoramento endócrino não invasivo depende de vários testes importantes como



demonstração de paralelismo, curva dose-resposta, validação fisiológica, entre outros, e por esta razão é sempre aconselhável a realização dos mesmos antes de sua real aplicação (Goymann, 2005; Touma; Palme, 2005). Paralelamente, sugere-se que este tipo de monitoramento hormonal seja sempre acompanhado de um esquema criterioso de observação e registro comportamental, a fim de facilitar a interpretação dos resultados.

Contudo, apesar de vários trabalhos terem sido realizados permitindo compreender a função dos hormônios sexuais na regulação da fisiologia, morfologia, comportamento e ecologia reprodutiva de aves selvagens, poucos são os trabalhos que envolvem interação entre hormônios sexuais e reprodução nas aves de rapina, dificultando a interpretação do funcionamento da biologia reprodutiva do grupo. De fato, apesar de serem poucos os trabalhos envolvendo hormônios sexuais e reprodução, estes já demonstraram ser possível dosar as concentrações de andrógenos, estrógenos e glicocorticoides, correlacionando-os com a atividade reprodutiva em algumas espécies de rapinantes (Bercovitz et al., 1982; Mayr et al., 1991; Wasser; Hunt 2005; Pereira et al., 2010; Blas et al., 2010). Com isso foi possível obter uma melhor interpretação da ecologia reprodutiva e da influência do ambiente na reprodução dos diferentes táxons do grupo.

#### *2.5.2 Técnicas de coleta de sêmen em aves de rapina*

Em rapinantes, três métodos de coleta de sêmen podem ser utilizados, a coleta cooperativa, a massagem manual e a eletroejaculação. A coleta cooperativa foi criada por falcoeiros usando aves de rapina “*imprintadas*”, que por manter uma associação muito próxima com seres humanos passa a



reconhecê-los como parceiro reprodutivo. Neste método, as aves copulam em dispositivos especiais (por exemplo, chapéus, manequins, luvas, casacos, poleiros, etc. Figura 2.1) em resposta a um estímulo comportamental como vocalização, alimentação e transferência de material para o ninho seguido de uma exposição copulatória (Blanco et al., 2007; Lierz, 2008). A vantagem na utilização desse método é que não há manipulação do animal, evitando o estresse ou risco de acidentes, além de obter geralmente amostras sem contaminação por urina ou fezes. No entanto, o volume seminal varia significativamente entre os indivíduos e algumas aves executam o comportamento de monta e cópula, porém, não conseguem ejacular ou produzem um sêmen oligozoospermico ou até mesmo azoospermico.



**Figura 2.1** - Coleta de sêmen cooperativa em falcão-gerifalte (*Falco rusticolus*) utilizando um chapéu coletor. Fonte: Juergen Kramer

A técnica da massagem manual foi inicialmente descrita por Quinn e Burrows (1936) e sua grande vantagem é que pode ser empregada em machos



reprodutivamente ativos, sem a necessidade do “*imprint*”. Em rapinantes algumas alterações no método original devem ser realizadas devido à agressividade e tamanho que algumas espécies apresentam (Figura 2.2). Para a realização desse procedimento, o macho deve ser contido sobre uma superfície de suporte, segurando a ave pelas pernas e imobilizando suas garras e asas para impedir qualquer lesão à ave e ao manipulador. O uso de meias ou capuz de falcoaria na cabeça é recomendado, tanto para diminuir o estresse quanto para evitar qualquer bicada. Em seguida, um segundo técnico estimula o abdômen e o ventre por meio de uma massagem rítmica em direção à porção caudal do corpo da ave. Na maioria dos casos esta massagem manual resulta em um reflexo ejaculatório, constituído pela elevação da cauda e estímulo cloacal; porém, a coleta só é completada quando o indicador e o polegar de uma das mãos executam uma leve pressão nas laterais da cloaca (Figura 2.2; B). O sêmen ejaculado pode ser coletado com o auxílio de tubos capilares ou micropipetas nas espécies de pequeno e médio porte, ou por meio de frascos acoplados a funis ou microtubos em espécies de maior porte (Blanco et al., 2009). Para que sejam obtidas boas amostras de sêmen via massagem manual, os machos devem ser previamente condicionados à manipulação por algumas semanas e selecionados quanto a sua resposta ejaculatória pós-estimulação (Pereira, 2014).



**Figura 2.2** - Coleta de sêmen em gavião-real (*Harpia harpyja*) pelo método da massagem. A - contenção do macho e; B - estimulação cloacal e coleta de sêmen com o auxílio de um capilar. Fonte: O autor, método realizado no CASIB – Foz do Iguaçu, Paraná.

Apesar de comumente utilizada em mamíferos selvagens, a técnica de eletroejaculação que, primeiramente, foi descrita em Anseriformes e Columbiformes, até o presente não é muito empregada em aves selvagens devido à necessidade de sedação e pela frequente contaminação do sêmen por fezes e urina (Gee; Temple, 1978; Blanco et al., 2009). Porém, recentemente, alguns trabalhos envolvendo a coleta por eletroejaculação em Psitaciformes descreveram uma técnica menos invasiva, em que não há a necessidade da contenção química (Lierz et al., 2013; Fisher et al., 2014).

O método consiste em conter a ave igualmente na técnica da massagem descrita anteriormente. Após a contenção, uma sonda retal adequada ao tamanho da ave é introduzida na cloaca para a aplicação de séries (2 – 6) de estímulos elétricos (2-6 V), que são aplicados em intervalos de dois segundos com pausas de 2 a 5 segundos entre cada estímulo (Pereira, artigo em preparação).



**Figura 2.3** – Coleta de sêmen em gavião-pega-macaco (*Spizaetus tyrannus*) pelo método da eletroejaculação realizada na Fundação Zoológico de São Paulo. A – contenção do macho previamente ao procedimento; B – estimulação cloacal através do transdutor retal e C – microscopia com aumento de 100x de um espermatozoide normal de gavião-de-penacho (*Spizaetus ornatus*), a = região do acrossoma, b = cabeça filiforme, c = peça intermediária e d = cauda do espermatozoide.

### 2.5.3 Qualidade e características do sêmen em aves de rapina

A característica do ejaculado em rapinantes varia em relação ao seu volume, concentração e motilidade de acordo com a espécie, método de coleta, nutrição, clima, período da estação reprodutiva e *imprint*. Machos criados por seus pais (incluindo aves selvagens), não costumam fornecer sêmen em todas as coletas e o ejaculado apresenta menores volumes, pois são mais





suscetíveis ao estresse de captura. Diferentemente dos machos imprintados, que se tornam melhores doadores de sêmen (Lierz, 2008).

O volume do sêmen normalmente aumenta de acordo com o tamanho da espécie, sendo descrito de 0,004 – 0,2mL em espécies de falcões, e pode chegar a até 1,4 mL em espécies de maior porte como o abutre-indiano-de-dorso-branco (*Gyps bengalensis*). A concentração espermática pode variar muito, sendo descrita entre 8 – 53 x10<sup>6</sup> spz/mL, para falcão quiri-quiri, entre 26 – 81 x10<sup>6</sup> spz/mL em falcão peregrino e 58 x10<sup>6</sup> spz/mL em *Gyps bengalensis* (Bird; Lague, 1977; Parks et al., 1986; Umapathy et al., 2005).

#### 2.5.4 Inseminação artificial em aves de rapina

A inseminação artificial (IA) proporciona de forma prática contornar diversos problemas reprodutivos em cativeiro, como a incompatibilidade entre casais, deficiências físicas que impossibilitam a cópula, agressividade acentuada devido a animais “*imprintados*”, baixa qualidade seminal, e assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas (Pereira, 2014). Além disso, a IA pode ser utilizada em animais geograficamente separados, ou até mesmo a introdução de material genético de animais mortos ou de animais selvagens via amostras criopreservadas.

A utilização da IA pode ser realizada de duas formas, em fêmeas *imprintadas* onde a ave é condicionada a apresentar interação sexual com o tratador, demonstrando postura copulatória e exposição do oviduto em resposta a estímulos vocais ou outros sinais de corte (Blanco et al., 2009). A utilização de fêmeas *imprintadas* reduz o estresse e induz um adiantamento da fase reprodutiva e um aumento na produção de ovos férteis. Porém, uma vez



condicionadas, as fêmeas cooperam com a IA regularmente e, em algumas situações, podem evitar a cópula natural. A segunda forma envolve a contenção da ave, que deve ser feita de forma rápida e de preferência realizada no seu viveiro para evitar o estresse do transporte. O uso de uma mesa é necessário para facilitar a contenção das asas e pernas, que devem ser mantidas em posição parecida com a da cópula, as garras devem ser imobilizadas e um capuz ou meia deve ser utilizado na cabeça para evitar bicadas e diminuir o estresse (Blanco et al., 2009). Concluída a contenção, a IA pode ser realizada em três regiões distintas: cloaca, vagina e magno.

A inseminação cloacal onde o sêmen é depositado direto na cloaca é o método mais simples, rápido e menos estressante, mas sua taxa de fertilidade é até quatro vezes menor quando comparada com a inseminação intravaginal (Blanco et al., 2009). Para efetuar a inseminação intravaginal é necessário visualizar a entrada do oviduto, processo realizado via espéculo vaginal ou pela reversão da cloaca. Esse método é normalmente utilizado em espécies de médio e grande porte como gaviões, águias e abutres. A técnica de espéculo vaginal é simples, o espéculo é levemente introduzido na cloaca com suas lâminas direcionadas para o lado esquerdo do corpo, e a entrada vaginal é visualizada com o auxílio de uma fonte de luz fria (Blanco et al., 2009). Após a visualização da entrada do oviduto, o sêmen pode ser depositado através de micropipetas, cateteres “franceses” ou palhetas de inseminação para galinhas. Em alguns casos o volume e número de espermatozoides no sêmen são muito baixos dificultando o sucesso da inseminação intravaginal. Dessa forma, Blanco et al, (2002) descreveram uma técnica de IA inovadora para aves de rapina, a inseminação intramagnal, técnica na qual um endoscópio contendo



um cateter de plástico estéril é inserido no oviduto para depositar o sêmen o mais próximo possível do sítio de fertilização (infundíbulo). Entretanto, mesmo que essa técnica já tenha gerado filhotes de águia-dourada, ela possui algumas limitações e exige algumas atenções durante sua utilização. Há necessidade de anestesiá-las ou sedar as fêmeas, risco de contaminação do trato reprodutor superior, e a exigência de equipamentos e técnicos especializados (Blanco et al., 2009). Outro fator importante a ser considerado sobre a utilização da inseminação intramagnal é que o procedimento limita a habilidade da fêmea selecionar os espermatozoides, aumentando o risco de mortalidade embrionária (Blanco et al., 2009).

O uso de sêmen fresco na IA está geralmente restrito a um período de 30-45 minutos pós-coleta, caso contrário, o sêmen pode ser resfriado ou criopreservado. Os objetivos principais do resfriamento são minimizar a taxa metabólica dos espermatozoides e diminuir a proliferação de microrganismos e, para isto, o sêmen é primeiramente misturado a um diluente (*Lake®* ou *Beltsville Poultry Semen Extender II®*, na proporção de 1:2 ou 1:3) para depois ser estocado em baixas temperaturas (5–7°C; Pereira, 2014). Em rapinantes, dois meios de criopreservação já foram testados, o glicerol e a dimetil-acetamina (Pereira, 2014). O volume das doses inseminantes e o número de inseminações varia de acordo com o tamanho das espécies. Espécies menores como falcões e pequenos gaviões recebem um volume de 30 – 100 µL, e espécies maiores como águias e abutres entre 100-200 µL. O protocolo de inseminação pode variar, sendo que espécies maiores são inseminadas duas vezes por semana durante duas semanas, antes do início da postura de ovos e depois de cada oviposição. Já em espécies que apresentam uma única



oviposição, aconselha-se começar a inseminação entre 7 a 14 dias antes da oviposição. Em espécies menores, a inseminação é realizada três vezes por semana durante a semana que antecede a oviposição (Lierz, 2008; Blanco et al., 2009).



## 2.6 Referências

- BAKST, M. R.; BIRD, M. Localization of oviductal sperm storage tubules in the American kestrel (*Falco sparverius*). **Auk**, v. 104, p. 321-324, 1987.
- BENTLEY, G. E.; TSUTSUI, K.; WINGFIELD, J. C. Endocrinology of reproduction. In: JAMIESON, B. G. M. **Reproductive biology and phylogeny of birds – Part A**. Enfield: Science Publishers, cap. 5, p. 181-242, 2007.
- BERCOVITZ, A. B.; COLLINS, J.; PRICE, P.; TUTTLE, D. Noninvasive assessment of seasonal hormone profile in captive bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). **Zoo Biology**, v. 1, p. 111-117, 1982.
- BIRD, D. M.; LAGUË, P. C. Semen production of the American kestrel. **Can. J. Zool**, v. 55 p. 1351-1358, 1977.
- BLANCO, J. M.; GEE, G. F.; WILDT, D. E.; DONOGHUE, A. M. Producing progeny from endangered birds of prey: treatment of urine-contaminated semen and a novel intramaginal insemination approach. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, p. 1-7, 2002.
- BLANCO, J. M.; BIRD, D. M.; SAMOUR, J. H. Physiology reproductive. In: BIRD, D. M.; BILDSTEIN, K. L. **Raptor research and management techniques**. Surrey: Hancock House Publishers, cap. 16C, p.286-292, 2007.
- BLANCO, J. M.; WILDT, D. E.; HÖFLE, U.; VOELKER, W.; DONOGHUE, A. M. Implementing artificial insemination as an effective tool for *ex situ* conservation of endangered avian species. **Theriogenology**, v.71, p. 200-213, 2009.
- BLAS, J.; LÓPEZ, L.; TANFERNA, A.; SERGIO, F.; HIRALDO, F. Reproductive endocrinology of wild, long-lived raptors. **General and Comparative Endocrinology**, v. 168, p. 22-28, 2010.
- BLESBOIS, E.; SEIGNEURIN, F.; GRASSEAU, I.; LIMOUZIN, C.; BESNARD, J.; GOURICHON, D.; COQUERELLE, G.; RAULT, P.; TIXIER-BOICHARD, M. Semen cryopreservation for *ex situ* management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank. **Poultry Science**, v. 86, p. 555-564, 2007.
- BRONNEBERG, R. G. G.; TAVERNE, M. A. M.; DIELEMAN, S. J.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V.; VERNOOIJ, J. C. M.; STEGEMAN, J. A. The relation between ultrasonographic observations in the oviduct and plasma progesterone, luteinizing hormone and estradiol during the egg laying cycle in ostriches. **Domest Anim Endocrinol**, v.32, p.15-28, 2007.
- CADE, T. M.; WEAVER, J. D.; PLATT, J. B.; BURNHAM, W. A. The propagation of large falcons in captivity. **Raptor Research**, v. 11, p. 28-48, 1977.



CHOWDHURY, V. S.; YAMAMOTO, K.; UBUKA, T.; BENTLEY, G. E.; HATTORI, A.; TSUTSUI, K. Melatonin stimulates the release of gonadotropin-Inhibitory hormone by the avian hypothalamus. **Endocrinology**, v. 151, p. 271–280, 2010.

COLWELL, M. A. Egg-laying intervals in shorebirds. **Wader Study Group Bulletin**, v. 111, p. 50-59, 2006.

DAWSON, A.; KING, V. M.; BENTLEY, G. E.; BALL, G. E. Photoperiodic control of seasonality in birds. **Journal of Biological Rhythms**. v. 16, p. 365-380, 2001.

DAWSON, A.; SHARP, P. J. Photorefractoriness in birds – photoperiodic and non-photoperiodic control. **General and Comparative Endocrinology**, v. 153, p. 378-384, 2007.

FERGUSON-LEES, J.; CHRISTIE, D. A. **Raptors of the world**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 1. ed. 320p, 2001.

FISHER, D.; NEUMANN, D.; PURCHASE, C.; BOUTS, T.; MEINECKE-TILLMANN, S.; WEHREND, A.; LIERZ, M. The use of semen evaluation and assisted reproduction in spix's macaws in terms of species conservation. **Zoo Biology**, p. 1-11, 2014.

GEE, G. F, TEMPLE, S. A. Artificial insemination for breeding non-domestic birds. **Symposia of the Zoological Society of London**, v. 43, p. 51-72, 1978.

GOYMANN, W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings - Physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1046 p. 75-80, 2005.

HAU, M. Timing of breeding in variable environments: tropical birds as model systems. **Hormones and Behavior**, v. 40, p. 281-290, 2001.

HAU, M.; PERFITO, N.; MOORE, I. Timing of breeding in tropical birds: mechanisms and evolutionary implications. **Ornitologia Neotropical**, v. 19, p. 39-59, 2008.

HIRSCHBERG, R. M. Anatomy and physiology. In: CHITTY, J.; LIERZ, M. **Manual of raptors, pigeons and passerine birds**. BSAVA, cap.5, p. 25-41, 2008.

HOOLIHAN, J.; BURNHAM, W. Peregrine falcon semen: a quantitative and qualitative examination. **Raptor Res**, v. 19, p. 125-127, 1985.

ISHIMARU, Y.; KOMATSU, T.; KASAHARA, M.; KATOH-FUKUI, Y.; OGAWA H.; TOYAMA, Y.; MAEKAWA, M.; TOSHIMORI, K.; CHANDRARATNA, R. A.



S.; MOROHASHI, K.; YOSHIOKA, H. Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. **Development**, v. 135, p. 677-685, 2008.

JOHNSON, A. L.; WOODS, D. C. Ovarian dynamics and follicle development. In: JAMIESON, B. G. M. **Reproductive biology and phylogeny of birds – Part A**. Enfield: Science Publishers, cap. 6, p. 243-277, 2007.

JUNG, J. G.; LIM, W.; PARK, T. S.; KIM, J. N.; HAN, B. K.; SONG, G.; HAN, J. Y. Structural and histological characterization of oviductal magnum and lectin-binding patterns in *Gallus domesticus*. **Reprod. Biol Endocrin**, v. 62, p. 1-12, 2011.

KANG, S. W.; THAYANANUPHAT, A.; BAKKEN, T.; EL HALAWANI, M. E. Dopamine-melatonin neurons in the avian hypothalamus controlling seasonal reproduction. **Neuroscience**, v. 150, p. 223-233, 2007.

KANG, S. W.; LECLERC, B.; KOSONSIRILUK, S.; MAURO, L. J.; IWASAWA, A.; EL HALAWANI, M. E. Melanopsin expression in dopamine-melatonin neurons of the premammillary nucleus of the hypothalamus and seasonal reproduction in birds. **Neuroscience**, v. 170, p. 200-213, 2010.

KÖNIG, C.; WEICK, F.; BECKING, J. **Owls of the World**. Yale University Press. 2 ed. 528p, 2009.

KUMAR, V.; WINGFIELD, J. C.; DAWSON, A.; RAMENOFISKY, M.; RANI, S.; BARTELL, P. Biological clock and regulation of seasonal reproduction and migration birds. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 83, p. 827-835, 2010.

LIERZ, M. Anatomy and physiology. In: CHITTY, J.; LIERZ, M. **Manual of raptors, pigeons and passerine birds**. BSAVA, cap.21, p. 235-249, 2008.

LIERZ, M.; REINSHMIDT, M.; MÜLLER, H.; WINK, M.; NEUMANN, D. A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (Psittaciformes). **Scientific Reports Nature**, v. 2066, p. 1-8, 2013.

MARTIN, J. M.; RAID, R. N.; BRANCH, L. C. **Barn owl (*Tyto alba*)**. University of Florida, 2011.

MAYS, N. A.; VLECK, C. M.; DAWSON, J. Plasma LH, steroid hormones, behavioral role, and nest stage in cooperatively breeding Harris' hawks. **Auk**, v. 108, p. 619– 637, 1991.

MCGAHAN, J. Ecology of the Golden eagle. **Auk**, v. 85, p. 1-12, 1968.

NEWTON, I. Breeding of sparrow hawks (*Accipiter nisus*) in different environments. **The Journal of Animal Ecology**, v. 45, p. 831-849, 1976.



PARKS, J. E.; HECK, W. R.; HARDASWICK, A. Cryopreservation of Peregrine falcon semen and post-thaw dialysis to remove glycerol. **Raptor Research**, v. 20, p. 15-20, 1986.

PEREIRA, R. J. G.; GRANZINOLLI, M. A. M.; DUARTE, J. M. B. Annual profile of fecal androgen and glucocorticoid levels in free-living male American kestrels from southern mid-latitude areas. **General and Comparative Endocrinology**, v. 166, p. 94-103, 2010.

PEREIRA, R. J. G. Reprodução das aves. In: CUBAS ZS, SILVA JCR, CATÃO-DIAS JL. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 2235-2269, 2014.

POLLOCK, C. G.; OROSZ, S. E. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. **Vet. Clin. Exot. Anim**, v.5, p. 441-474, 2002.

QUINN, J. P.; BURROWS, W. H. Artificial insemination in fowls. **Journal Heredity**, v. 27, p. 31-37, 1936.

REED-JUNIOR, R. B.; COPE, L. A.; BLACKFORD, T. Macroscopic anatomy of the reproductive tract of the reproductively quiescent female emu (*Dromaius novaehollandiae*). **Anat. Histol. Embryol**, v. 40, p. 134-141, 2011.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M. A.; XAVIER, E. G.; ROLL, V. F. B.; ROSSI, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 31, p. 307-317, 2007.

SMITH, C. A. Molecular genetics of avian sex determination and gonadal differentiation. In: JAMIESON, B. G. M. **Reproductive biology and phylogeny of birds – Part B**. Enfield: Science Publishers, cap. 13, p. 479-506, 2007.

TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolic in mammals and birds: the importance of validation. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 54-74, 2005.

UMAPATHY, G.; SONTAKKE, S.; REDDY, A.; AHMED, S.; SHIVAJI, S. Semen characteristics of the captive Indian White-Backed Vulture (*Gyps bengalensis*). **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 1039-1045, 2005.

UBUKA, T.; BENTLEY, G. E. Neuroendocrine control of reproduction in birds. In: NORRIS, D. O; LOPEZ, K. H. **Hormones and Reproduction of Vertebrate – volume 4 Birds**. Elsevier, cap 1.p, 1-26, 2011.

WASSER, S. K.; HUNT, K. E. Noninvasive measures of reproductive function and disturbance in the barred owl, great horned owl and Northern spotted owl. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 1-29, 2005.





### **3. CAPÍTULO 3 – <sup>2</sup>Perfil anual de andrógenos em machos de gavião-real (*Harpia harpyja*) e sua correlação com comportamento reprodutivo e fatores ambientais na região sul do Brasil.**

Resumo: Nas últimas décadas, muitos estudos têm analisado o papel dos hormônios esteroides na regulação da atividade reprodutiva em aves selvagens. Como consequência, já é estabelecido que alterações sistêmicas nos níveis de esteroides sexuais regulam a função reprodutiva de um modo cíclico, ajustando a fisiologia, a morfologia e o comportamento das espécies de acordo com sua estratégia reprodutiva. Apesar do progresso acentuado, a maioria desses estudos concentra-se em grupos filogenéticos específicos e muitas espécies de aves ainda não apresentam estudos relacionados. Dessa forma, o presente estudo validou ensaios imunoenzimáticos para a quantificação de metabólitos de andrógenos fecais em gavião-real, com o intuito de investigar mudanças sazonais na atividade esteroidogênica testicular, e estabelecer possíveis correlações com comportamento reprodutivo e fatores ambientais, além de fornecer informações que possam ser utilizadas no aprimoramento do manejo reprodutivo da espécie. No geral, os níveis de andrógenos não apresentaram diferença significativa entre as estações ( $P > 0,05$ ) e indivíduos reprodutores e não reprodutores (Médias: 28,22 e 18,53 ng/g, respectivamente). Estudos recentes apoiam a ideia de que espécies que estabelecem um sistema de reprodução monogâmico não necessitam de níveis altos de andrógenos circulantes para a reprodução. Estes resultados também apoiam o fato da baixa fertilidade e problemas de reprodução em cativeiro não estarem relacionados à infertilidade de machos, e sim, a problemas



*Perfil anual de andrógenos em machos de gavião-real...*

---

relacionados ao pareamento, a não aceitação da monta pela fêmea e a falhas de manejo reprodutivo.

**Palavras-chave:** Reprodução, Esteroides sexuais, Andrógenos, Sazonalidade reprodutiva, Aves tropicais, Aves de rapina, Enzimoimunoensaio, Accipitridae.



**CHAPTER 3 - Annual profile of fecal androgen and its correlation with reproductive behavior and environmental factors in male harpy eagle (*Harpia harpyja*) in southern Brazil.**

Abstract: In the last decades many studies have examined the role of steroid hormones in the regulation of reproduction activity in wild birds. As a consequence, it is established that systemic alterations in the levels of sex steroids regulate reproductive function in a cyclic manner by adjusting physiology, morphology and behavior of the species, according to their reproductive strategy. Although of the progress, the great majority of these studies have focused on specific phylogenetic groups and many species of birds were not studied yet. Thus, this study validated enzymeimmunoassay (EIA) for the quantification of fecal androgen metabolites in harpy eagle, in order to investigate seasonal changes in testicular and adrenal steroidogenic activity and their correlation to reproductive behavior and environmental factors. In addition, to provide information that could be used in improving the reproductive management of the species. Overall, androgen levels did not differ between seasons ( $P > 0,05$ ) and breeding and non-breeding individuals (mean: 28, 22 e 18, 53 ng/g) recent studies support the idea that species that establish a monogamous mating system do not require high levels of circulating androgens for reproduction. These results also support the fact of low fertility and captive breeding problems are not related to male fertility, but due to problems related to pairing, rejection of the male and reproductive management failures.



*Perfil anual de andrógenos em machos de gavião-real...*

---

**Keywords:** Reproduction, Sex steroids, Androgens, Breeding season, Tropical birds, Birds of Prey, Enzymeimmunoassays, EIA, Accipitridea.



### 3.1 Introdução

Em 2013, a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) relatou que aproximadamente 13% de todas as 9.930 espécies de aves existentes no mundo estavam ameaçadas de extinção, e estimativas indicam que este número continuará a crescer nos próximos anos (*Birdlife International*, 2013). O gavião-real (*Harpia harpyja*) é o maior representante da família Accipitridae na região neotropical (4 – 9 kg) e é considerada uma das mais imponentes águias do mundo. Habita principalmente florestas tropicais úmidas de terras baixas, e sua distribuição ocorre de forma descontínua do sul do México ao norte da Argentina (Ubaid et al., 2011; Aguiar-Silva et al., 2014). Apesar da ampla distribuição, a espécie é considerada quase ameaçada (IUCN, 2014), e está listada no Anexo I (espécies ameaçadas de extinção) da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Selvagens (CITES). Além das ameaças antrópicas, a espécie apresenta lentas taxas de reprodução, com dois ou mais anos, sendo considerado um dos mais longos períodos de reprodução entre as aves de rapina (Piana, 2007; Lerner et al., 2009). Uma das ações propostas para a conservação da espécie é estabelecer a reprodução em cativeiro, possibilitando a reintrodução e suplementação das populações *in situ* (IUCN, 2014). Entretanto, a reprodução da espécie em cativeiro é débil, sendo que nos últimos 40 anos poucas foram as instituições que obtiveram sucesso em sua reprodução, ou seja, alcançaram o nascimento seguido do completo desenvolvimento do filhote. Neste contexto, estudos que possam, de alguma forma, melhorar o desempenho reprodutivo da espécie em cativeiro, assim



como possibilitar a criação e manutenção de um banco genético são válidos. Porém, informações sobre a biologia reprodutiva da espécie foram obtidas somente através de observações comportamentais (Rettig, 1978), o que dificulta a compreensão dos mecanismos que regulam a atividade reprodutiva da espécie. Dessa forma, o estudo da fisiologia reprodutiva pode apresentar um grande avanço na interpretação dos fatores que regulam a atividade reprodutiva do gavião-real. Podendo também, gerar informações importantes para aprimorar a manutenção e a reprodução da espécie em cativeiro.

Em vista disso, estudos endócrinos, com uma abordagem não invasiva de esteroides sexuais, têm contribuído substancialmente no manejo e reprodução de espécies ameaçadas em cativeiro (Schwarzenberger; Brown, 2013). E nas últimas décadas, um aumento considerável de estudos tem analisado o papel dos hormônios sexuais no comportamento e na ecologia reprodutiva de populações de aves selvagens, assim como tem avaliado a interferência das flutuações climáticas sazonais na biologia reprodutiva de aves (Staley et al., 2007; Maney, 2008; Wingfield et al., 2008). Entretanto, a grande maioria desses estudos tem utilizado passeriformes como modelo na investigação da influência de fatores ambientais e comportamentais na atividade reprodutiva, negligenciando uma fração significativa de outros grupos de aves, como as aves de rapina pertencentes à família Accipitridae (Blas et al., 2010). Dessa forma, o presente estudo avalia o perfil anual de andrógenos em machos de gavião-real, assim como, sua correlação com diferentes comportamentos reprodutivos e com as mudanças sazonais climáticas locais.



Tais resultados objetivam fornecer evidências que possam contribuir no manejo e na conservação *in situ* e *ex situ* da espécie.

### **3.2 Material e Métodos**

Este estudo foi realizado em estrito acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA/UFPR - Setor Palotina) sob o protocolo nº 14/2013-CEUA/Palotina. A coleta e transporte das amostras biológicas (fezes) foram autorizadas pelo SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, sob protocolo nº 38990-1.

#### **3.2.1 Área de estudo**

O monitoramento comportamental e coleta das fezes de gavião-real (*H. harpyja*) foram realizados no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), localizado no município de Foz do Iguaçu, porção oeste do Estado do Paraná (25°26'57"S; 54°33'18"W), com altitude média de 200 metros. A região oeste do Paraná pertence à área de domínio natural da ecorregião das Florestas do Alto Rio Paraná ou Mata Atlântica de Interior. Próximo do Rio Paraná, a paisagem desta região foi toda constituída por Floresta Estacional Semidecidual Submontana e Aluvial, além de pontuais Formações Pioneiras de Influência Aluvial (Rinaldi, 2014). O CASIB está localizando dentro do Refúgio Biológica Bela Vista – RBV (Latitude -25,43° e Longitude -54,58°) pertencentes ao complexo da usina hidrelétrica de ITAIPU,



e é o limite mais ao sul do seu reservatório hidrelétrico, possui área de 1.908 hectares e é constituído por alguns elementos paisagísticos principais. Podemos indicar as áreas de remanescentes florestais, áreas de recuperação florestal, áreas antropizadas abertas, pontuais formações pioneiras fluviais e áreas de uso antrópico intensivo (Rinaldi, 2014). O clima da região é do tipo Cfa segundo a classificação de Koeppen, subtropical úmido mesotérmico com chuvas bem distribuídas durante o ano e verões quentes. A precipitação média anual é de 1.712 mm, o mês que apresenta maior precipitação é março e menor precipitação é agosto, no entanto não existe uma estação seca definida. A temperatura média mensal é de 20,7°C, o mês mais quente tem a temperatura média de 25,6°C e o mês mais frio tem temperatura média de 14,8°C (Maack, 2002).

### 3.2.2 Animais e Recintos

Entre agosto de 2013 e dezembro de 2014, três machos de gavião-real em idade reprodutiva foram utilizados no experimento. Todos os animais passaram por uma avaliação clínica prévia e foram pesados (Informações detalhadas sobre cada indivíduo encontram-se expostas na Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** - Dados dos machos de gavião-real (*Harpia harpyja*) utilizados no projeto.

Macho	Idade	Peso (kg)	Origem	Manejo (Pareamento)	Histórico reprodutivo
Macho 1	8 anos	4800	Vida livre	Há 3 anos	Não
Macho 2	14 anos	5800	Vida livre	Há 11 anos	Sim
Macho 3	15 anos	5900	Vida livre	Há 4 anos	Sim





Os animais eram mantidos em recintos do tipo câmara de cria com isolamento completo, ou seja, sem acesso da visitação e acesso restrito de técnicos e tratadores. Cada recinto apresentava uma área de 42,84m<sup>2</sup> (3,86m largura x 11,10m comprimento x 5,22m altura), um cambiamento interno de 16,36m<sup>2</sup>, um abrigo com 8,3m<sup>2</sup> e solário com 18,21m<sup>2</sup>. Para evitar possíveis fugas, os recintos apresentavam corredores de segurança na frente 40,32m<sup>2</sup> e fundos 36,54m<sup>2</sup>. Entre os recintos há uma barreira de alvenaria e, a tela é constituída com arame de 2,5mm e malha de 3cm, apresenta piso com cimento alisado sob o abrigo e grama no solário e cambiamento. O ninho é mantido elevado a uma altura de 3,5m, apresentando dimensões de 1,5m de comprimento e 2m de largura, construído com gravetos, galhos e troncos, e protegido sob o abrigo. O recinto é ambientado com poleiros de diferentes diâmetros, tanque para banho com diâmetro de 2,4m com profundidade de 30 cm e volume aproximado de 0,6m<sup>3</sup>, a água é fornecida *ad libitum*. Os recintos estão equipados com canos de alimentação (frente e fundos) de PVC com circunferência de 100mm, apresentando inclinação de 45 graus, os canos conectam a parte externa e interna do recinto, evitando o contato visual dos animais com o tratador durante a alimentação. A alimentação era realizada três vezes por semana (segunda, quarta e sexta) alternando os horários entre manhã e tarde. Os itens alimentares ofertados eram ratos inteiros, coelho em partes e cabeça de coelho, sempre na proporção de 10% do peso do gavião-real em alimento.



**Figura 3.1** - Local do estudo, Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), animais e estrutura dos recintos. A – Macho adulto de gavião-real (*Harpia harpyja*), ao fundo observa-se a fêmea e ninho; B – Vista geral do bloco de três recintos, em detalhe o corredor de segurança e janelas de manejo do ninho; C – Vista interna do recinto, observar a ambientação dos poleiros, tanque e área de câmbio ao fundo; D – Vista do fundo do câmbio, observar a altura e posição do ninho sobre o abrigo. Imagem A – Fonte: o autor; Imagens B, C e D – Fonte: Marcos José de Oliveira.



### 3.2.3 Coleta de Dados: Meteorológicos, Comportamental e de Amostras Fecais

De agosto de 2013 a dezembro de 2014 três machos pareados foram acompanhados semanalmente para observação comportamental e coleta de amostras fecais. Na tentativa de controlar os possíveis efeitos do ritmo circadiano sobre a atividade comportamental e excreção de andrógenos fecais, o monitoramento comportamental para todas as aves foi realizado entre as 07h00min e 15h00min, totalizando 8 horas de observação por dia. A coleta das fezes foi padronizada entre as 09h00min e 12h00min. Com a finalidade de relacionar os dados reprodutivos ao clima e sua implicação na sazonalidade reprodutiva da espécie, dados meteorológicos sobre temperatura (TEMPE), pluviosidade (PLUVI) e fotoperíodo (FOTO) foram coletados diariamente durante o experimento. Todos os dados foram obtidos através da estação meteorológica automática de Foz do Iguaçu – Paraná (Altitude de 321m, Latitude 25°36'S e Longitude 54°29'W).

Para a realização do monitoramento comportamental um sistema de câmeras foi instalado em cada recinto, uma câmera capturava imagens contínuas do ninho e área de cambiamento, enquanto a outra câmera capturava imagens da área do solário. As imagens eram armazenadas de hora em hora (60min no formato XGA (1024 x720) para o DVR SRD-880D Samsung®) e transmitidas em tempo real (monitor Samsung® 17 polegadas LCD *Widescreen* com separação para seis canais). O *backup* dos vídeos era realizado semanalmente em período pré-determinado. Para realizar as coletas de amostras fecais, era realizada uma busca dos vídeos armazenados do dia



da coleta a partir das 6h00min até o momento exato da coleta, sempre identificando o macho e os pontos onde somente ele excretava (evitando assim, coletar amostra da fêmea). Dessa forma, procurava-se coletar o máximo de amostras fecais durante o período estipulado com a finalidade de evitar problemas associados ao pequeno volume e, priorizando sempre a coleta das amostras mais frescas, descartando a porção urinária das amostras. As amostras eram armazenadas em microtubos plásticos (2 ml) e armazenadas em *freezer* (-20°C) até o momento da liofilização e extração dos andrógenos.

#### 3.2.4 *Dados Comportamentais*

Dados comportamentais foram coletados semanalmente por vídeo monitoramento, as gravações foram feitas de forma contínua entre as 07h00min e 15h00min (totalizando oito horas de observação). Anotações sobre o número de comportamentos apresentados por cada macho durante o período de observação foram efetuadas para os seguintes comportamentos: fornecimento de comida do macho para a fêmea (FCFE), número de cópulas (CÓPULA), atividade do macho no ninho (vezes em que o macho entrava no ninho para levar galhos, organizar, interagir com a fêmea, fornecer alimento à fêmea e interagir com o ovo; ATININHO), tempo de permanência do macho dentro do ninho ou realizando alguma atividade relacionada ao ninho (por exemplo, buscando galhos e folhas; TEMPNINHO) e aproximação do casal (tempo em que o macho permanecia próximo da fêmea interagindo; APRCA). Neste caso, foi considerado próximo da fêmea quando o macho encontrava-se empoleirado no mesmo poleiro menos de 2m um do outro. Todos os dados comportamentais foram coletados e avaliados pelo mesmo observador.



### 3.2.5 Extração Fecal e Ensaio Imunoenzimático

O protocolo de extração dos andrógenos fecais foi baseado na metodologia descrita por Tempel; Gutierrez (2004) e modificada por Pereira et al. (2010). Previamente ao processo de liofilização, as amostras fecais foram acondicionadas em *freezer* a  $-30^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e, posteriormente, liofilizadas (Liotop-L108, São Carlos, São Paulo, Brasil) por aproximadamente 24 horas, sendo em seguida trituradas. Após as etapas de liofilização e trituração, 0,5 g de fezes foi colocado em tubos de ensaio de vidro contendo 5ml de metanol PA 80%, agitadas em Vórtex (Scientific-M37615, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) por 30 segundos e posteriormente em agitador horizontal (Orbit 1000, Labnet International Inc., New Jersey, EUA) por 14 horas. Amostras que pesaram menos que 0,5 g foram colocadas em tubos de ensaio contendo uma quantidade proporcional de metanol 80% (por exemplo, 0,2 gramas de fezes para 0,2 ml de metanol), e também agitadas em Vórtex por 30 s e agitador horizontal por 14 horas em 250 RPM. Após agitação, as amostras foram centrifugadas (Scientific-Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) em 400G por 20 minutos e o sobrenadante transferido para tubo de ensaio de vidro e estocado em *freezer* a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

As concentrações de andrógenos fecais foram mensuradas em duplicata (alíquotas de 100  $\mu\text{l}$  do extrato fecal foram diluídas em 300  $\mu\text{l}$  de tampão EIA na proporção 1:4), utilizando o protocolo para ensaio imunoenzimático descrito por Brown et al., (2004). O anticorpo monoclonal contra andrógenos (fornecido pela Dra. Coralie Munro, University of California, Davis, CA, EUA) utilizado foi o R156/7 que possui reatividade cruzada de: 100% para testosterona; 57,3%



para 5 $\alpha$ -di-hidrotestosterona; 0,4% para androsterona; 0,2% para androstenediona; e <0,04% para todos os demais metabólitos testados (Pereira et al., 2010). Este ensaio foi previamente validado seguindo os princípios de validação (Goymann, 2005), utilizando os testes descritos por Brown et al. (2004): Demonstração da curva de paralelismo entre diluições seriadas dos extratos (1:2 a 1:2048) e a curva padrão (0,045 – 12 ng/mL), curva de dose-resposta ( $y = 0,6283x + 1,8424$ ,  $r^2 = 0,9989$ ), sensibilidade (0,04 ng/mL), precisão (coeficiente de variação inter e intra-ensaio <12% e <8% respectivamente), além da demonstração de validação biológica através da correlação entre os níveis de andrógenos e comportamentos reprodutivos observados (cópula).

### 3.2.6 *Análise Estatística*

As Concentrações mensais de andrógenos fecais são apresentadas na forma de média e erro-padrão. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados diferenças significativas com cálculos realizados pelo SAS (*System for Windows 9.00*; SAS Institute Incorporation, Cary, NC, EUA). Logaritmos das concentrações de andrógenos fecais foram empregados em todas as análises. Comparações entre os níveis médios de andrógenos fecais, dados comportamentais (cópula, fornecimento de alimento, aproximação do casal, tempo de permanência no ninho e atividade no ninho) e climáticos (temperatura, pluviosidade e fotoperíodo) foram testados entre os diferentes meses e estações, utilizando a análise GLM (*General Linear Model*), seguida pelo teste de Tukey. Adicionalmente, foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson entre todos os parâmetros: níveis de andrógenos fecais,



cópula, fornecimento de alimento, aproximação do casal, tempo de permanência no ninho, número de entradas no ninho, temperatura, pluviosidade e fotoperíodo.

### **3.3 Resultados**

Durante o período amostral, todos os casais ( $n = 3$ ) acompanhados apresentaram algum tipo de atividade reprodutiva, seja desempenhando comportamentos de confecção e organização do ninho, corte, cópula, postura e incubação de ovos. Neste período, seis ciclos de postura foram acompanhados, produzindo um total de dez ovos e nascimento de seis filhotes. O casal um (macho 1) apresentou a postura de um ovo infértil, o casal dois (macho 2) apresentou a postura de seis ovos, todos férteis, porém, ocorreu a quebra de dois ovos, um aos 36 dias de incubação e outro aos 25 dias de incubação e, o casal três (macho 3) apresentou a postura de um ovo infértil e dois ovos férteis. Todos os ovos foram retirados da incubação natural para verificar a fertilidade e, em seguida, os ovos férteis foram colocados em incubadora artificial.

Resumindo, os casais apresentaram uma média de 1,71 ovos postos em cada ciclo de postura com índice de fertilidade de 80%. Dentre os ovos férteis, 75% dos ovos apresentaram eclodibilidade, com índice de sobrevivência de 66,67%. Podemos observar (Tabela 3) que a média de tempo em que os ovos permaneceram sob o cuidado dos pais foi de 48,8 dias e o abandono do ninho pela fêmea ocorreu em média 5,4 dias após a retirada dos ovos.



**Tabela 3.2.** Atividade reprodutiva dos casais de gavião-real (*Harpyia harpyja*) durante o estudo (Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu – PR, Brasil).

Casais	Data de Postura*	Data de retirada de ovos**	Data de Eclosão***	Período de Incubação****	Fertilidade
01	15/10/2014	28/11/2014	Não houve	45/60 dias	Infértil
02	04/11/2013	27/12/2013	27/12/2013	53 dias	Fértil
	10/11/2013	27/12/2013	01/01/2014	48/52 dias	Fértil
	03/02/2014	Não Houve	Não Houve	36 dias	Fértil
	10/02/2014	26/03/2014	07/04/2014	44/56 dias	Fértil
	20/11/2014	08/01/2015	12/01/2015	49/53 dias	Fértil
	26/11/2014	Não Houve	Não Houve	25 dias	Fértil
03	15/12/13	03/02/2014	Não Houve	50 dias	Infértil
	11/12/14	27/01/2015	05/02/2015	47/54 dias	Fértil
	17/12/14	27/01/2015	11/02/2015	41/56 dias	Fértil

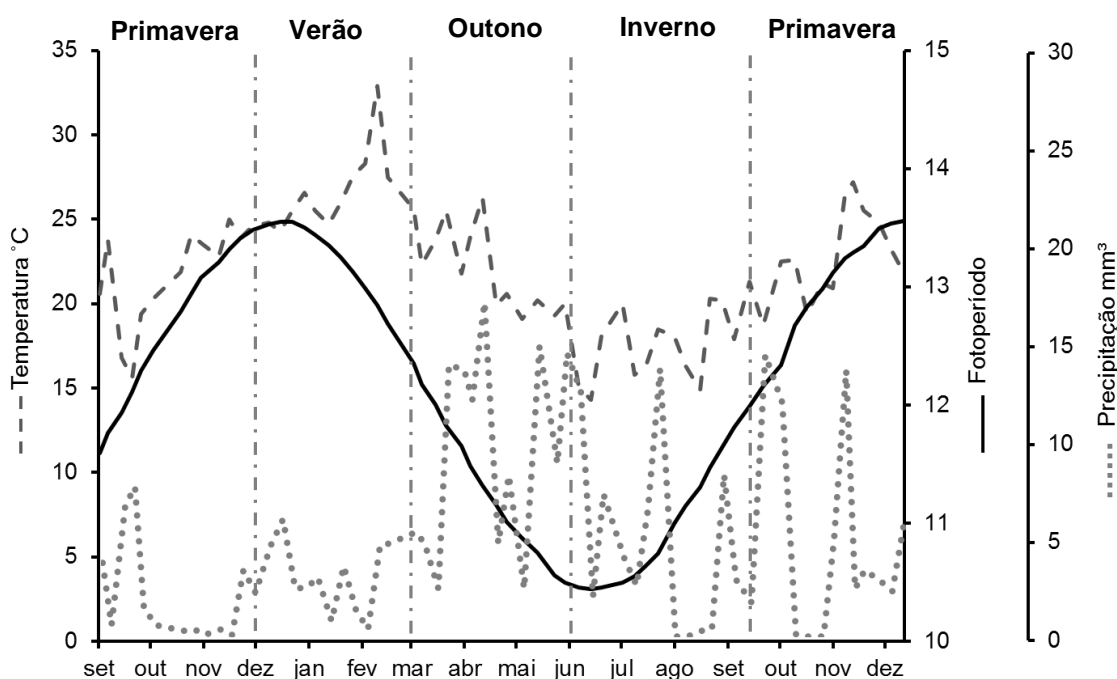
\*Data provável da postura a partir da primeira visualização do ovo; \*\*Data das retiradas de ovos dos casais para incubação artificial; \*\*\*Datas considerando que a ordem de nascimento corresponde com a ordem da postura dos ovos; \*\*\*\*Tempo em que o ovo foi incubado naturalmente/Tempo total de incubação considerando a incubação natural e artificial.

Os dados referentes à precipitação semanal média, temperatura semanal média e fotoperíodo da cidade de Foz do Iguaçu encontram-se resumidos na Figura 3.2. A variação máxima do fotoperíodo foi de 3,10 horas de luz/dia, com maior incidência de luz no início do verão 13,55h e menor incidência de luz no início do inverno 10,45h (dezembro e junho respectivamente). A precipitação média semanal variou entre 0,00 e 17,60mm<sup>3</sup>,





sendo que, a maior média de precipitação ( $10,08 \pm 5,35 \text{ mm}^3$ ) foi encontrada para os meses de outono, diferindo de inverno, primavera e verão ( $4,03 \pm 3,94 \text{ mm}^3$ ,  $3,72 \pm 4,45 \text{ mm}^3$ ,  $3,40 \pm 1,85 \text{ mm}^3$  respectivamente) ( $P > 0,05$ ). Paralelamente, as temperaturas médias apresentaram uma variação máxima de  $18,6^\circ\text{C}$  (máxima de  $32,9^\circ\text{C}$  em fevereiro e mínima de  $14,3^\circ\text{C}$  em junho).



**Figura 3.2** - Dados climáticos (temperatura, fotoperíodo e precipitação semanal média) da cidade de Foz do Iguaçu de setembro de 2013 a dezembro de 2014.

Dados referentes aos níveis de andrógenos fecais, número de cópulas, atividade no ninho e período de postura de ovos encontram-se resumidos individualmente na Figura 3.3. A média de andrógenos fecais durante o inverno ( $8,33 \pm 6,74 \text{ ng/g}$ ) apresentou os menores valores comparados entre as demais estações ( $9,78 \pm 8,85 \text{ ng/g}$  Outono;  $26,36 \pm 84,16 \text{ ng/g}$  Primavera;  $16,27 \pm 21,54 \text{ ng/g}$  Verão) e indivíduos ( $7,71 \pm 3,26 \text{ ng/g}$  Macho 1;  $11,16 \pm 10,59 \text{ ng/g}$  Macho 2;  $6,14 \pm 2,60 \text{ ng/g}$  Macho 3), concomitantemente, neste mesmo período os animais não apresentaram comportamentos de cópula, e a média



da atividade no ninho foi menor ( $1,53 \pm 0,72$  atividades/ oito horas de monitoramento) comparando com as demais estações. Entretanto, o Macho 2 apresentou um aumento do nível de andrógenos durante o mês de agosto ( $108,59$  ng/g), subsequentemente apresentou aumentos na atividade no ninho e cópulas foram observadas 46 dias após a elevação de andrógenos. As maiores médias de andrógenos fecais foram encontradas durante a primavera ( $26,36 \pm 84,16$  ng/g) coincidindo com o período em que os indivíduos apresentaram maior frequência de cópula e atividade no ninho ( $0,48 \pm 0,18$  atividade / oito horas de monitoramento;  $5,61 \pm 0,80$  cópula / oito horas de monitoramento;  $P < 0,05$ ), respectivamente. Posturas de ovos foram realizadas subsequentemente às observações de pico de andrógenos, picos de entrada no ninho e picos de cópula (Tabela 3.3), exceto na primeira postura do Casal 3 (Figura 3.3; Macho 3), onde não ocorreu pico de andrógenos pré-postura. Machos apresentaram maior atividade no ninho ( $28,75 \pm 3,50$  dias) antes de começar a copular, apresentaram maior atividade no ninho ( $44,80 \pm 1,80$  dias) antes de a fêmea realizar a postura de ovos e começaram a apresentar comportamentos de cópula ( $37,00 \pm 2,97$  dias) antes de a fêmea realizar a postura (Tabela 3.3).

O comportamento de cópula foi observado entre setembro e maio, enquanto que a média mais alta entre os meses deste parâmetro foi registrada em novembro ( $0,88 \pm 0,67$  cópula/ 32 horas de monitoramento;  $P < 0,05$ ). Cópulas foram observadas oito e nove dias após a retirada de ovos do ninho no Casal 2 (Figura 3.3; Macho 2), em Janeiro e Março de 2014, respectivamente. Concomitantemente, picos na atividade no ninho ocorreram



de outubro a maio, sendo que a média mais alta deste parâmetro foi observada em novembro ( $8,50 \pm 1,18$  atividade/ 32 horas de monitoramento;  $P < 0,05$ ). O fornecimento de alimento para a fêmea foi documentado em todas as estações (Figura 3.4), porém, uma maior frequência de fornecimento de alimento foi registrada durante a primavera ( $0,26 \pm 0,09$  fornecimento/ 32 horas de monitoramento;  $P < 0,05$ ), coincidindo com o maior período de cópulas (Machos 2 e 3).

Em média os machos de gavião-real permaneceram mais tempo junto das fêmeas durante a primavera ( $30,59 \pm 3,49$  tempo/ 32 horas de monitoramento) e verão ( $33,59 \pm 8,33$  tempo/ 32 horas de monitoramento) do que no outono ( $17,89 \pm 2,68$  tempo/ 32 horas de monitoramento) e inverno ( $23,27 \pm 3,69$  tempo/ 32 horas de monitoramento;  $P < 0,05$ ; Figura 3.4). Sendo janeiro o mês em que os casais permaneceram mais tempo juntos ( $56,57 \pm 20,14$  tempo/ 32 horas de monitoramento) e março o mês em que os casais ficaram menos tempo juntos ( $13,44 \pm 1,56$  tempo/ 32 horas de monitoramento). Os machos permaneceram mais tempo no ninho durante a primavera ( $12,45 \pm 2,47$  tempo/ 32 horas de monitoramento) e verão ( $6,19 \pm 2,54$  tempo/ 32 horas de monitoramento) do que no outono ( $0,83 \pm 0,35$  tempo/ 32 horas de monitoramento) e inverno ( $3,29 \pm 1,61$  tempo/ 32 horas de monitoramento;  $P < 0,05$ ; Figura 3.4).

Com o intuito de identificar uma variação dos níveis de andrógenos em machos reprodutores (apresentaram ovos férteis), classificaram-se as amostras em quatro grupos: Pré-Cópula (amostras coletadas durante a fase que antecedia o primeiro registro de cópula, até quatro semanas antes), Cópula



(amostras coletadas durante os registros de cópula), Pós-Cópula (amostras coletadas após a postura e término do período de cópula, até duas semanas depois) e Fora de estação (Todas as outras amostras que não foram classificadas nas fases anteriores). As médias e erro-padrão da média encontram-se na Figura 3.5.

Com o intuito de verificar se houve diferença nos níveis de andrógenos fecais entre machos reprodutores (apresentaram ovos férteis) e não reprodutores (não apresentaram ovos férteis) foram selecionadas amostras durante o período pré-postura de ovos (até sete semanas antes de cada postura). O período determinado foi influenciado pelos resultados apresentados na Tabela 3.3, que demonstra que picos de andrógenos foram relatados aproximadamente 50 dias antes da postura de ovos. As médias e erro-padrão da média encontram-se na Figura 3.6.

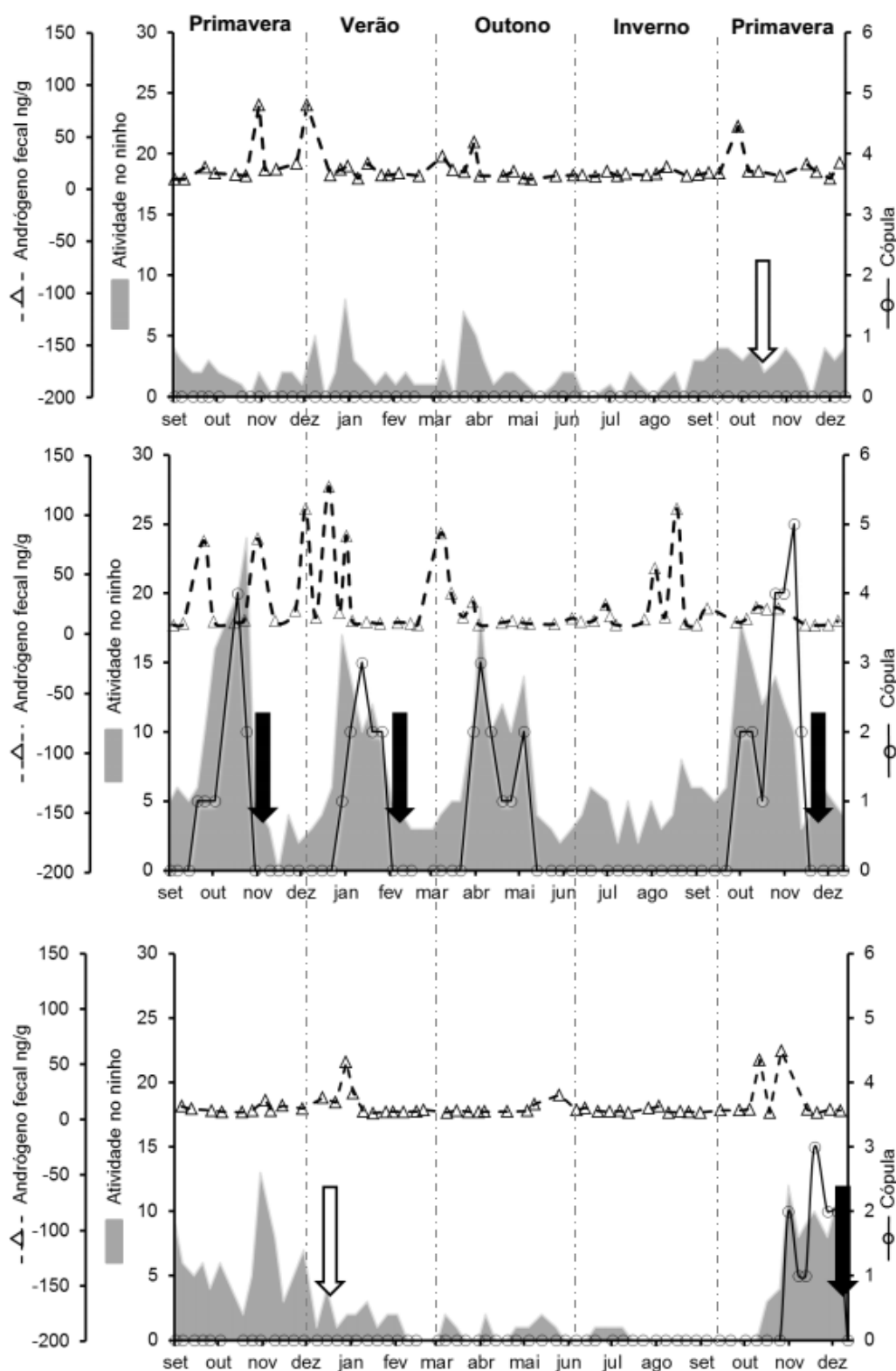
Em busca da detecção de um nível de andrógeno fecal característico aos machos com potencial reprodutivo, foi classificado cada amostra do período de setembro de 2013 a dezembro de 2014 dos machos reprodutores (Machos 2 e 3), em quatro fases: Pré-Cópula (amostras coletadas durante a fase que antecedia o primeiro registro de cópula, até 4 semanas antes), Cópula (amostras coletadas durante os registros de cópula), Pós-Cópula (amostras coletadas após a postura e término do período de cópula, até duas semanas depois) e Fora de estação (Todas as outras amostras que não foram classificadas nas fases anteriores), que se encontram resumidos na Figura 3.7.



As correlações entre os comportamentos analisados e os níveis de andrógenos fecais e fatores climáticos encontram-se detalhados na Tabela 3.4. Os níveis de andrógenos fecais não apresentaram correlação com nenhuma das variáveis testadas ( $P > 0,05$ ). Correlações positivas foram observadas entre as seguintes variáveis: cópula e fornecimento de alimento do macho para a fêmea ( $r^2 = 0,48$ ,  $P < 0,01$ ); cópula com aproximação do casal ( $r^2 = 0,31$ ,  $P < 0,01$ ); cópula com tempo de permanência do macho no ninho ( $r^2 = 0,33$ ,  $P < 0,01$ ); cópula com atividade do macho no ninho ( $r^2 = 0,60$ ,  $P < 0,01$ ); fotoperíodo com tempo de permanência do macho no ninho ( $r^2 = 0,33$ ,  $P < 0,01$ ). Correlações negativas foram observadas entre fotoperíodo e pluviosidade ( $r^2 = -0,28$ ,  $P < 0,01$ ).



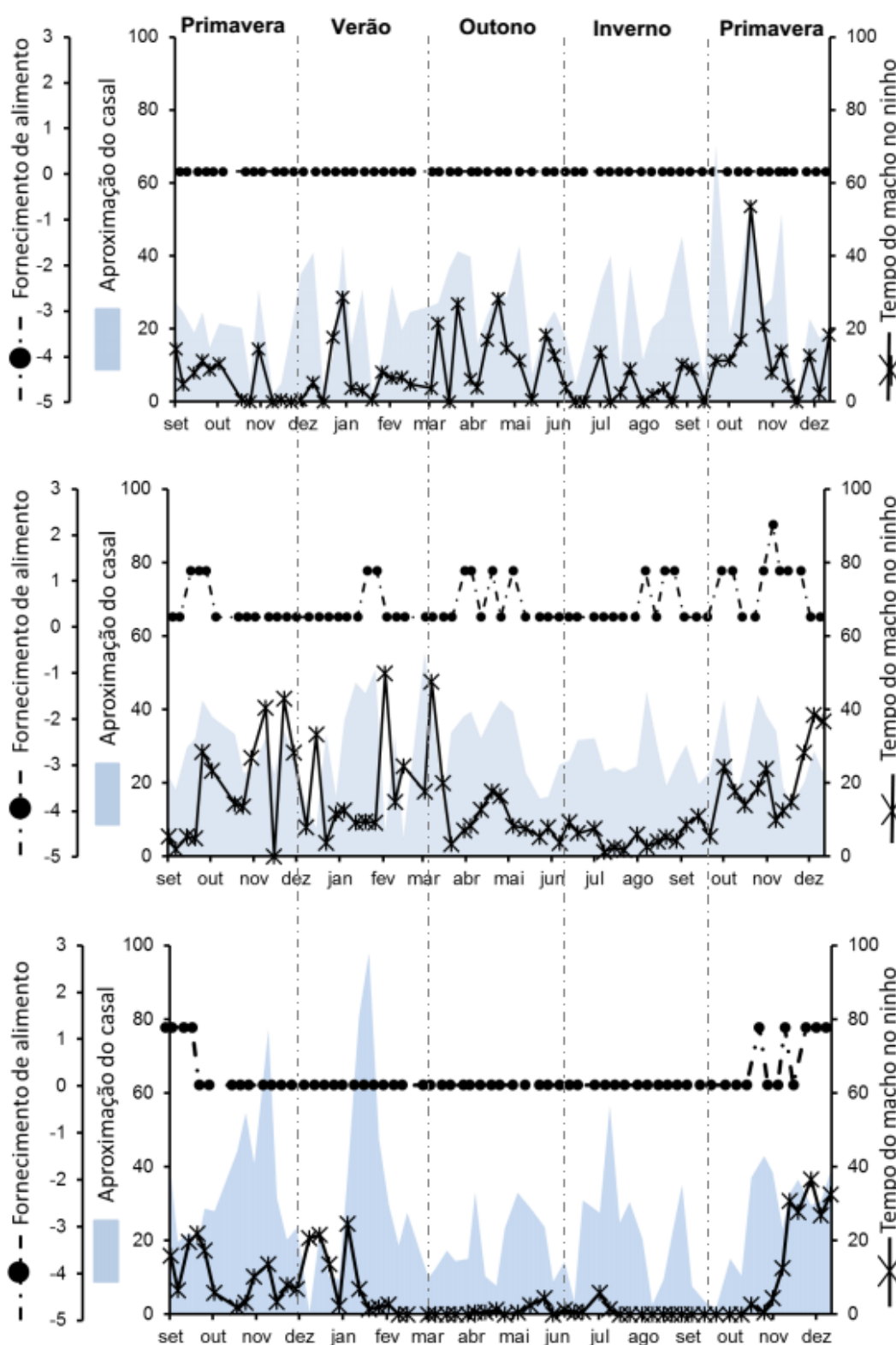
*Perfil anual de andrógenos em machos de gavião-real...*



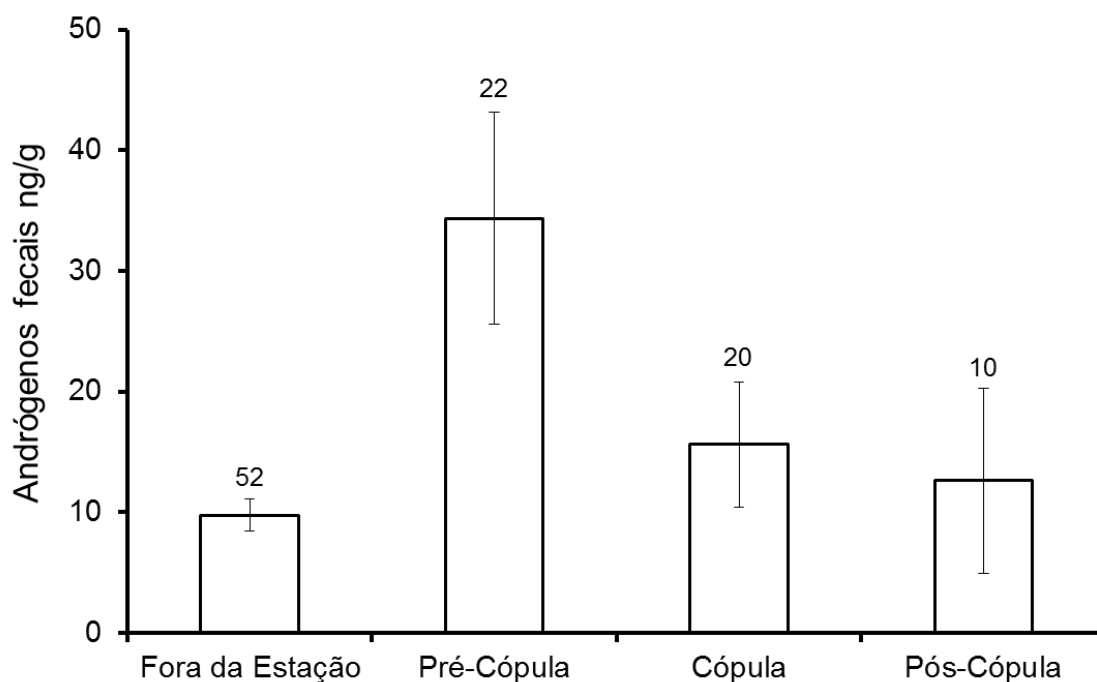
**Figura 3.3** - Perfil sazonal da secreção de andrógenos fecais e comportamentos reprodutivos (atividade no ninho e cópulas): Setas preenchidas indicam a data da postura de ovos férteis e setas não preenchidas indicam a data da postura de ovos inférteis. Os gráficos estão dispostos individualmente (Machos 1, 2 e 3, respectivamente).



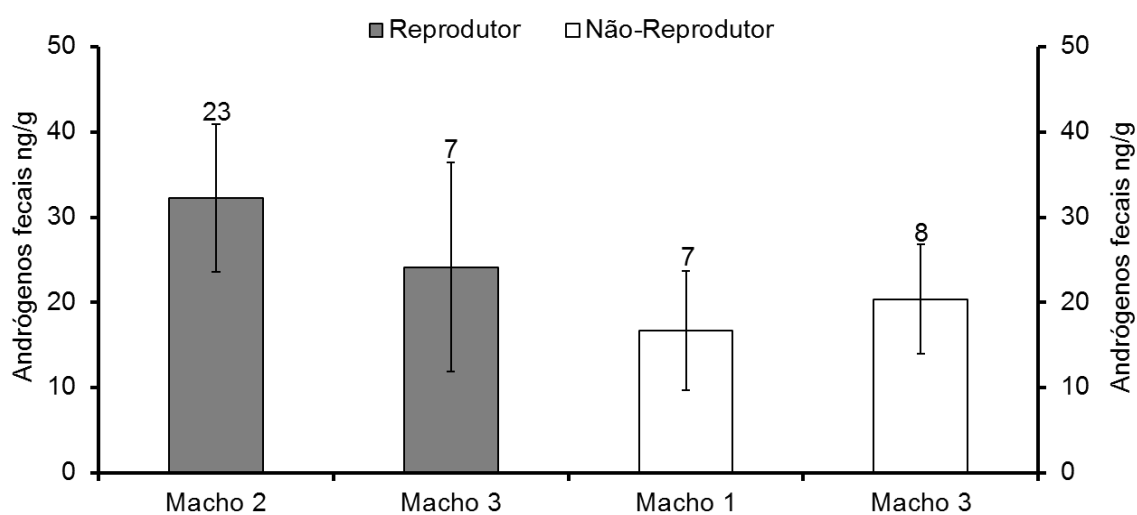
*Perfil anual de andrógenos em machos de gavião-real...*



**Figura 3.4** - Variação sazonal de comportamentos reprodutivos (fornecimento de alimento do macho para a fêmea, aproximação do casal e tempo de permanência do macho no ninho) em machos de gavião-real (*H. harpyja*). Cada gráfico representa um animal (Machos 1, 2 e 3, respectivamente).

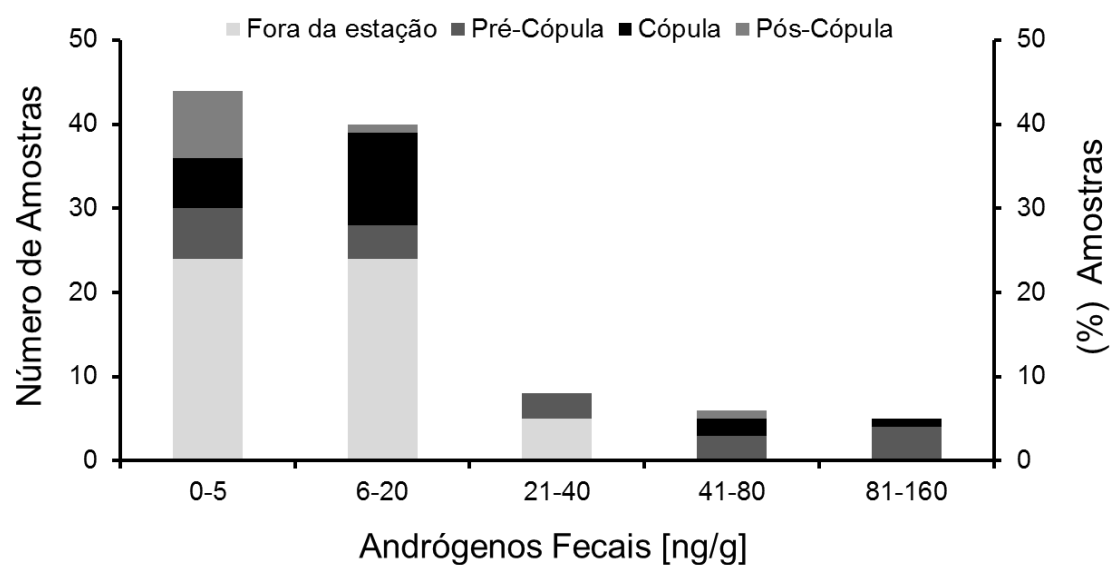


**Figura 3.5** - Média ( $\pm$ EPM) dos níveis de andrógenos fecais de machos reprodutores de gavião-real (*Harpia harpyja*) classificados de acordo com a época reprodutiva. Números acima das barras indicam o número de amostras analisadas.



**Figura 3.6** - Média ( $\pm$ EPM) dos níveis de andrógenos fecais de machos de gavião-real (*Harpia harpyja*) classificados entre, machos reprodutores e não reprodutores. Números acima das barras indicam o número de amostras analisadas.





**Figura 3.7** - Número de amostras por intervalo de níveis de andrógenos fecais de machos de gavião-real (*Harpia harpyja*) classificadas conforme época reprodutiva.

**Tabela 3.3.** Características reprodutivas de machos de gavião-real (*Harpia harpyja*)

	Intervalo	Intervalo	Intervalo	Intervalo	Intervalo	Intervalo
	Pico A – Pico B	Pico A – Pico C	Pico A – Pico D	Pico B – Pico C	Pico B – Pico D	Pico C – Pico D
Macho 1	12 ± 5 (7 – 17)		13		42	
Macho 2	32,5 ± 4,73 (24 – 46)	36,5 ± 6,87 (23 – 53)	59,67 ± 16,13 (35 – 90)	31,67 ± 2,73 (28 – 37)	44 ± 2,31 (40 – 48)	37,67 ± 4,09 (30 – 44)
Macho 3	30 ± 8 (22 – 38)	21	56	20	50	35
Média ± EPM	26,75 ± 4,30	33,4 ± 6,68	49,6 ± 12,74	28,75 ± 3,50	44,8 ± 1,85	37 ± 2,97

Dias são apresentados através da média e erro padrão da média (EPM) dos intervalos entre os picos de andrógenos (A), picos de atividade no ninho (B), picos de cópula (C) e picos de postura de ovos (D). O intervalo mínimo e máximo está apresentado dentro do (parênteses), o Macho 1 não apresentou cópula, dessa forma não houve comparações.

**Tabela 3.4.** Correlações entre as concentrações de andrógenos fecais (ng/g) com diferentes comportamentos reprodutivos e fatores ambientais locais, analisados em machos de gavião-real (*Harpia harpyja*).

VARIÁVEIS									
VARIÁVEIS	CÓPULA	FCFE	APRCA	TEMPNINHO	ATININHO	TEMPE	PLUVI	FOTO	ANDRO
<b>CÓPULA</b>	1	<b>0,48673*</b>	<b>0,31446*</b>	<b>0,33008*</b>	<b>0,60129*</b>	0,15451	-0,01729	0,17413	-0,01976
	----	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0,0338	0,8133	0,0166	0,8072
<b>FCFE</b>	----	1	0,21136	<b>0,26555**</b>	<b>0,4604*</b>	-0,00104	0,01845	0,08093	-0,07223
	----	----	0,0035	0,0002	<.0001	0,9887	0,801	0,2683	0,3718
<b>APRCA</b>	----	----	1	<b>0,33765*</b>	<b>0,43682*</b>	0,0148	-0,0352	0,03731	-0,01539
	----	----	----	<.0001	<.0001	0,8399	0,6307	0,6103	0,8492
<b>TEMPNINHO</b>	----	----	----	1	<b>0,64667*</b>	0,18863	0,01011	<b>0,33716*</b>	0,1932
	----	----	----	----	<.0001	0,0093	0,8902	<.0001	0,016
<b>ATININHO</b>	----	----	----	----	1	0,13604	-0,06074	<b>0,27757*</b>	0,14701
	----	----	----	----	----	0,062	0,4064	0,0001	0,0679
<b>TEMPE</b>	----	----	----	----	----	1	-0,04906	<b>0,70538</b>	0,06754
	----	----	----	----	----	----	0,5026	<.0001	0,4037
<b>PLUVI</b>	----	----	----	----	----	----	1	<b>-0,28443*</b>	-0,09901
	----	----	----	----	----	----	----	<.0001	0,2203
<b>FOTO</b>	----	----	----	----	----	----	----	1	0,20577
	----	----	----	----	----	----	----	----	0,0102
<b>ANDRO</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	1

A primeira linha de cada coluna corresponde aos valores de  $r^2$  e, a segunda linha de cada coluna corresponde aos valores do P. Variáveis testadas; cópula, fornecimento de alimento do macho para a fêmea (FCFE), aproximação do casal (APRCA), tempo de permanência do macho no ninho (TEMPNINHO), atividade do macho no ninho (ATININHO), temperatura ambiente (TEMPE), pluviosidade mm<sup>3</sup> (PLUVI), fotoperíodo (FOTO) e andrógenos fecais (ANDRO). \* Significativo ao nível de 1% de probabilidade / \*\* Significativo ao nível de 2% de probabilidade.



### **3.4 Discussão**

Os dados apresentados indicam que o método empregado foi eficaz na detecção de metabólitos fecais imunorreativos de andrógenos, uma vez que os resultados de desempenho dos ensaios imunoenzimáticos (paralelismo, curva de dose-resposta e precisão) mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis (Brown et al., 2004; Palme, 2005). Concomitantemente, pôde ser observada a elevação dos níveis de andrógenos fecais previamente a eventos comportamentais reprodutivos de cópula (Figura 3.3). Estes eventos, em conjunto, caracterizam a validação biológica dos ensaios imunoenzimáticos (Brown et al., 2004; Touma; Palme, 2005). Dessa forma, o presente estudo comprovou a aplicabilidade da dosagem de andrógenos fecais na avaliação da condição reprodutiva de machos de gavião-real, e o aprimoramento do manejo reprodutivo da espécie pode ter seu princípio na análise dos valores das dosagens de andrógenos fecais obtidas neste trabalho.

Elevações nas médias de andrógenos fecais foram documentadas durante a primavera e verão, coincidindo com uma maior atividade reprodutiva dos machos (construção do ninho, corte alimentar, cópula e postura de ovos) e, possivelmente, com o aumento da massa testicular (Figura 3.3). Estes resultados apoiam estudos que relataram uma associação positiva entre os níveis de andrógenos com a espermatogênese (Hirschenhauser et al., 1999), e com alguns comportamentos sexuais, por exemplo, corte, cópula e construção de ninho (Mays et al., 1991), embora a excreção de andrógenos fecais não tenha apresentado diferença estatística ( $P > 0,05$ ) comparando as estações. Este resultado apoia estudos que indicam que a variação estacional de



andrógenos (testosterona) não apresenta uma grande flutuação sazonal em aves de regiões neotropicais e afrotropicais, diferentemente das espécies de altas latitudes que apresentam altos níveis de andrógenos e uma ampla flutuação da sua concentração ao longo do ano (Goymann; Wingfield, 2004; Hau et al., 2008a). Segundo Goymann et al. (2004), a variação dos níveis de andrógenos diminui consideravelmente de acordo com a diminuição da latitude e alguns fatores podem pré-determinar os níveis de andrógenos em aves tropicais. Por exemplo, a duração da estação reprodutiva é um dos principais fatores que interferem a concentração de andrógenos (quanto menor a época de reprodução maior a concentração de andrógenos) e espécies que estabelecem um território sazonal apresentam maior concentração de andrógenos comparada com espécies territoriais e coloniais (Goymann et al., 2004; Hau et al., 2008a). Essas informações corroboram com nossa interpretação, visto que o gavião-real apresenta uma estação reprodutiva teoricamente longa e o casal estabelece um território fixo.

Através da análise dos resultados, podemos considerar que a espécie apresenta uma sazonalidade reprodutiva em latitudes meridionais. As médias mensais dos andrógenos fecais demonstraram que a atividade esteroidogênica apresenta um declínio acompanhado de uma diminuição das atividades no ninho, comportamentos de corte e cópula, a partir da segunda metade de maio, perdurando até a primeira metade de agosto, coincidindo com as menores exposições ao fotoperíodo (< 10,87 horas/luz) e as temperaturas médias mais baixas do ano (< 16°C) e correlações positivas entre fotoperíodo, atividade do macho no ninho e tempo de permanência do macho no ninho foram



observadas ( $P < 0,05$ ). Tal perfil hormonal assegurou que os níveis de secreção de andrógenos aumentassem durante a primavera, após o aumento do fotoperíodo ( $> 11,60$  horas/luz) e da temperatura ambiente ( $> 20^{\circ}\text{C}$ ), coincidindo com os dados descritos para falconiformes neotropicais localizados em latitudes meridionais (Pereira et al., 2010). Esses resultados reforçam a hipótese de que espécies tropicais também utilizam de fatores preditivos como o fotoperíodo no ajuste temporal da estação reprodutiva, diferindo das espécies de clima temperado apenas por apresentar uma estação reprodutiva prolongada e uma grande variabilidade interespecífica quanto à época de postura e nascimento dos filhotes (Hau, 2001; Hau et al., 2008b).

De modo geral, a sazonalidade reprodutiva tem sido moldada pela sazonalidade do ambiente e o fotoperíodo é utilizado como principal regulador da atividade reprodutiva (Hau et al., 1998; Hau, 2001). Aves de altas latitudes vivem em ambientes onde os recursos necessários para a reprodução variam de maneira previsível ao longo do ano, ao mesmo tempo em que estão altamente correlacionados com a variação sazonais do comprimento do dia (Wingfield et al., 1992; Hau, 2001). Entretanto, aves que habitam baixas latitudes estão expostas a uma redução gradual tanto das amplitudes das flutuações sazonais quanto em sua previsibilidade durante o ano, e dessa forma, utilizam-se de mecanismos suplementares no ajuste preciso da estação reprodutiva, como pluviosidade, temperatura e disponibilidade de alimento (Wikelski et al., 2000; Hau, 2001; Dawson; Sharp, 2007). Embora os estágios iniciais do desenvolvimento gonadal sejam amplamente dependentes de fatores não alimentares, a disponibilidade de alimento pode agir como um



mecanismo de previsibilidade para o início da estação reprodutiva. Em rapinantes, a densidade de criação pode ser motivada principalmente pela abundância alimentar (Mougeot, 2004), visto que muitas espécies desenvolveram mecanismos de corte relacionada ao oferecimento de alimento. Por exemplo, a ocorrência de fêmeas de peneireiro-de-dorso-malhado (*Falco tinnunculus*) com posturas adiantadas e maiores ninhadas correlacionou-se positivamente com o maior volume de caça proporcionado por seus parceiros, ao mesmo tempo em que a suplementação artificial de alimento antecipou a data de postura da espécie (Meijer et al., 1990). Dessa forma, no presente estudo a abundância de alimento foi distribuída igualmente durante todas as estações, sendo possível observar uma correlação positiva entre FCFE e CÓPULA ( $P < 0,05$ ), que possivelmente possa ter influenciado juntamente com a retirada de ovos do ninho uma atividade reprodutiva prolongada (até o outono), sendo interrompida somente após uma diminuição do fotoperíodo ( $< 10,87$  horas/luz) e da temperatura ambiente ( $< 16^{\circ}\text{C}$ ). Assim, acreditamos que na natureza a espécie também possa utilizar mecanismos suplementares na regulação do eixo-hipotalâmico-hipofisário-gonadal para início e término da sua estação reprodutiva, e que a abundância de alimento no ambiente juntamente com a temperatura, possa talvez influenciar a atividade reprodutiva.

Durante a estação reprodutiva oscilações nas concentrações de andrógenos fecais em machos de gavião-real foram também acompanhadas por mudanças nas frequências comportamentais. Diminuições nas concentrações de andrógenos ocorreram após a postura de ovos (período pós-cópula) e período de incubação (fora de estação) (Figura 3.5). Estes dados



apoiam estudos que relatam uma queda nos níveis de andrógenos durante a fase de postura dos ovos e criação dos filhotes em rapinantes (Rehder et al., 1988; Blas et al., 2010). Este fenômeno pode ser considerado normal em espécies que apresentam um sistema de reprodução monogâmico, onde normalmente a espécie apresenta uma única ninhada por estação reprodutiva e os machos desempenham uma alta participação no cuidado parental (Buntin et al., 1991; Lormée et al., 2000; Khan et al., 2001; Sockman et al., 2004).

Outro aspecto interessante é que, geralmente picos da concentração de andrógenos foram verificados  $33,4 \pm 6,68$  dias antes do primeiro registro de cópula (Tabela 3.3), apresentando um resultado semelhante ao descrito por Pereira et al. (2010) em falcão quiri-quiri. Subsequentemente, as cópulas iniciaram  $37,00 \pm 2,97$  dias antes da postura de ovos (Tabela 3.3) e machos de gavião-real apresentaram um período de cópulas férteis (resultando em nascimento de filhotes) de 128 dias (setembro – fevereiro; Figura 3.3), sendo que cópulas foram observadas nove dias após a retirada de ovos. Estes resultados indicam que mesmo com uma baixa dos níveis de andrógenos pós-cópula e durante o período de incubação de ovos (fora de estação; Figura 3.5) os machos de gavião-real continuaram apresentando atividade androgênica e produção de espermatozoides. Tal fenômeno foi documentado por Gomes (2014), que registrou eventos de cópula após fornecimento de alimento no ninho em uiraçu-falso (*Morphnus guianensis*) durante o período de cuidado parental (filhote com aproximadamente 17 dias), indicando que mesmo durante o período em que os níveis de andrógenos teoricamente possam estar





menores, ainda há estimulação de comportamentos reprodutivos e possivelmente produção de espermatozoides.

Embora o tempo para a ocorrência da espermatogênese em rapinantes seja desconhecida, o período de produção de sêmen geralmente dura três meses em espécies do grupo (Blanco et al., 2007). Portanto, era de se esperar que machos que fertilizaram ovos possuísem maiores níveis de andrógenos comparando com machos que não apresentaram fertilização de ovos durante a fase que antecipava a postura de ovos (Pico de Andrógenos – Pico de Postura Tabela 3.4; 50 dias aproximadamente). Entretanto, podemos verificar na Figura 3.6 que ambos os grupos (reprodutores e não reprodutores) não apresentaram diferença estatística entre os perfis de andrógenos. Segundo Rehder et al. (1988), diferenças nos níveis de andrógenos durante a estação reprodutiva entre indivíduos reprodutores e não reprodutores em espécies monogâmicas podem estar relacionados com a competição entre machos por potenciais parceiras e busca por território. Sendo que esta suposição é reforçada por diversas pesquisas envolvendo aves de clima temperado, as quais demonstraram que níveis de testosterona são especialmente altos nas fases de estabelecimento de territórios e formação de casais (Levin; Wingfield, 1992; Hau et al., 2000; Hau et al., 2008a). Porém, tal evento não foi observado no presente estudo, possivelmente devido os machos já apresentarem casais definitivos e apresentarem um território determinado.

Avaliando os perfis de andrógenos, observou-se que não há diferença das concentrações médias entre animais reprodutores e não reprodutores. Isto indica que problemas de infertilidade nos ovos de gavião-real observados no



presente estudo não estão relacionados à atividade gonadal nos machos, e sim a outros fatores como, por exemplo, a incompatibilidade dos casais, falhas durante a cópula ou falhas de manejo.

É possível avaliar que amostras com níveis de andrógenos acima de 41 ng/g de fezes (Figura 3.7) são de machos que estão apresentando atividade reprodutiva e possuem grande potencial de reprodução, usando a mensuração hormonal não invasiva como ferramenta na seleção de machos aptos a reproduzir. Outro ponto importante, é que entre machos reprodutores e não reprodutores não houve diferença estatística na secreção de andrógenos e, possivelmente amostras com níveis acima de 20 ng/g de fezes (Figura 3.6) correspondem a machos que podem apresentar atividade androgênica e produção espermática, incluindo potencial em técnicas de reprodução assistida, como a coleta de sêmen e inseminação artificial.

Avaliando os resultados, algumas informações apresentam grande potencial na aplicação de técnicas de reprodução assistida para a espécie. Em comparação, o falcão-quiri-quiri (*Falco sparverius*) apresenta um período médio de produção espermática de 74 dias, o falcão-peregrino (*Falco peregrinus*) de 95 dias e algumas espécies de águias de regiões temperadas apresentam um período de até 110 dias (Bird; Langüe, 1977; Blanco et al., 2007). Entretanto, em gavião-real (*H. harpyja*) pôde ser observado um período de cópulas férteis por 128 dias (setembro – fevereiro; Figura 3.7), indicando que coletas de sêmen podem ser realizadas por períodos prolongados na espécie e, mesmo o macho estando em estágios pós-cópula (realizando incubação e cuidado parental) pode ser realiza a coleta de sêmen. Tal fato pode ser justificado, pois



cópulas férteis foram realizadas poucos dias após a retirada de ovos do ninho, indicando que mesmo durante o período de incubação e cuidado parental ainda há ação da espermatogênese e produção de espermatozoides. Fato também documentado em psitacídeos neotropicais (Francisco et al., 2014). Outro resultado importante, é que o período entre o início das cópulas e postura de ovos foi de  $37,00 \pm 2,97$  dias, avaliando os protocolos de inseminação descritos por Blanco et al. (2009), juntamente com estes resultados, a inseminação artificial para a espécie pode ser realizada até 30 dias antes da oviposição de uma a duas vezes por semana, e uma vez após a postura de cada ovo.

Assim, conclui-se que no presente estudo, foi possível comprovar a aplicabilidade da dosagem de andrógenos fecais na avaliação da condição reprodutiva de machos de gavião-real (*Harpia harpyja*). Além de apresentar uma aplicação importante no manejo reprodutivo da espécie, podendo ser utilizada na identificação de machos aptos a reproduzir e com uso potencial em técnicas de reprodução assistida. Também se conclui que a espécie pode apresentar uma janela de reprodução longa, e mesmo durante períodos de fotorrefratariedade onde há uma diminuição do número de horas de luz/dia, foi possível observar comportamentos de cópula e atividade de ninho. Tais eventos podem ter sido influenciados pela retirada de ovos e pela disponibilidade de alimento regular durante todo ano, indicando que além do fotoperíodo a disponibilidade de alimento pode ser um fator chave na reprodução e na determinação do período reprodutivo para a espécie.



### 3.5 Referências

- AGUIAR-SILVA, F. H.; SANAIOTTI, T. M.; LUZ, B. B. Food habits of the Harpy Eagle, a top predator from the Amazonian rainforest canopy. **The Journal of Raptors Research**, v. 48, p. 24-35, 2014.
- BIRD, D. M.; LAGÜE, P. C. Semen production of the American Kestrel. **Can. J. Zool**, v. 55, p. 1351-1358, 1977.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Saving the world's most threatened birds: the BirdLife Preventing Extinctions Program**. Cambridge, 2013.
- BLANCO, J. M.; BIRD, D. M.; SAMOUR, J. H. Physiology reproductive. In: BIRD D M, BILDSTEIN, KL. **Raptor research and management techniques**. Surrey: Hancock House Publishers, cap. 16C, p. 286-292, 2007.
- BLANCO, J. M.; WILDT, D. E.; HÖFLE, U.; VOELKER, W.; DONOGHUE, A. M. Implementing artificial insemination as an effective tool for *ex situ* conservation of endangered avian species. **Theriogenology**, v.71, p. 200-213, 2009.
- BLAS, J.; LÓPEZ, L.; TANFERNA, A.; SERGIO, F.; HIRALDO, F. Reproductive endocrinology of wild, long-lived raptors. **General and Comparative Endocrinology**, v. 168, p. 22-28, 2010.
- BUNTIN, J. D.; BECKER, G. M.; RUZYCKI, E. Facilitation of parental behavior in ring doves by systemic or intracranial injections of prolactin. **Horm. Behav**, v. 25, p. 424–444, 1991.
- BROWN, J. L.; WALKER, S.; STEINMAN, K. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species**. Endocrine Research Laboratory, National Zoological Park—Smithsonian Institution, Front Royal. 2004.
- DAWSON, A., SHARP, P.J. Photorefractoriness in birds—photoperiodic and no photoperiodic control. **General and Comparative Endocrinology**, v. 153, p. 378–384, 2007.
- FRANCISCO, L. R.; VALDUGA, M. O.; MOREIRA, N. Resposta reprodutiva à retirada de ovos e filhotes de psitacídeos neotrópicos em cativeiro. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 38, p. 25-31, 2014.



GOMES, F. B. R. **Distribuição e ecologia do uiraçu-falso (*Morphnus guianensis*, Daudin, 1800)**. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Amazonas. 129p. 2014.

GOYMANN, W.; WINGFIELD, J. C. Competing female and caring males. Sex steroids in African black coucals, *Centropus grillii*. **Anim. Behav.**, v. 68, p. 533-540, 2004.

GOYMANN, W.; MOORE, I. T.; SCHEUERLEIN, A.; HIRSCHENHAUSER, K.; GRAFEN, A.; WINGFIELD, J. C. Testosterone in tropical birds: effects of environmental and social factors. **Am. Nat.**, v. 164, p. 327-334, 2004.

GOYMANN, W. Non-invasive monitoring of hormones in bird droppings: biological validations, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1046, p. 35–53, 2005.

HAU, M.; MIKELSKI, M.; WINGFIELD, J. C. A Neotropical forest bird can measure the slight changes in tropical photoperiod. *Proc R. Soc. Lond. B*, v. 265, p. 89-95, 1998.

HAU, M.; MIKELSKI, M.; SOMA, K.; WINGFIELD, J. C. Testosterone and year-round territorial aggression in a tropical bird. **General and Comparative Endocrinology**, v. 117, p. 20–33, 2000.

HAU, M. Timing of breeding in variable environments: tropical birds as model systems. **Hormones and Behavior**, v. 40, p. 281-290, 2001.

HAU, M.; GILL, S. A.; GOYMANN, W. Tropical field endocrinology: Ecology and evolution of testosterone concentration in male birds. **General and Comparative Endocrinology**, v. 157, p. 241-248, 2008a.

HAU, M.; PERFITO, N.; MOORE, I. Timing of breeding in tropical birds: mechanisms and evolutionary implications. **Ornitologia Neotropical**, v. 19, p. 39-59, 2008b.

HIRSCHENHAUSER, K.; MÖSTL, E.; KOTRSCHAL, K. Seasonal patterns of sex steroids determined from faeces in different social categories of greylag geese (*Anser anser*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, p. 67–79, 1999.



INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. IUCN Red list of threatened species. Disponível em [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acesso em 5 de dez. 2014.

KHAN, M.Z.; MCNABB, F. M. A.; WLATERS, J. R.; SHARP, P. J. Patterns of testosterone and prolactin concentrations and reproductive behavior of helpers and breeders in the cooperatively breeding red-cockaded woodpecker (*Picoides borealis*). **Horm. Behav.** v. 40, p. 1–13, 2001.

LERNER, H. R. L.; JOHNSON, J. A.; LINDSAY, A. R.; KIFF, L. F. E MINDELL, D. P. It's not too late for the Harpy Eagle (*Harpia harpyja*): High levels of genetic diversity and differentiation can fuel conservation programs. **PLOS ONE**, v.4, n. 10, 2009.

LORMÉE, H.; JOUVENTIN, P.; LACROIX, A.; LALLEMAND, J.; CHASTEL, O. Reproductive endocrinology of tropical seabirds: sex-specific patterns in LH, steroids, and prolactin secretion in relation to parental care. **General and Comparative Endocrinology**, v. 117, p. 413–426, 2000.

LEVIN, R.N., WINGFIELD, J.C., 1992. The hormonal control of territorial aggression in tropical birds. **Ornis Scand**, v. 23, p. 284–291, 1992.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. 3ed, Curitiba: Imprensa Oficial, 2002.

MANEY, D. L. Endocrine and genomic architecture of life history trade-offs in an avian model of social behavior. **General and Comparative Endocrinology**, v. 157, p. 275–282, 2008.

MAYS, N. A.; VLECK, C. M.; DAWSON, J. Plasma LH, steroid hormones, behavioral role, and nest stage in cooperatively breeding Harris' hawks. **The Auk**, v. 108, p. 619– 637, 1991.

MEIJER, T.; DAAN, S.; HALL, M.R. Family planning in the kestrel (*Falco tinnunculus*): the proximate control of laying date and clutch size. **Behaviour**, v. 114, p. 117–136, 1990.

MOUGEOT, F. Breeding density, cuckoldry risk and copulation behavior during the fertile period in raptors: a comparative analysis. **Animal Behaviour**, v. 67, p. 1067-1076, 2004.

PALME, R. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 1046, p. 1–6, 2005.



- PEREIRA, R. J. G.; GRANZINOLLI, M. A. M.; DUARTE, J. M. B. Annual profile of fecal androgen and glucocorticoid levels in free-living male American kestrels from southern mid-latitude areas. **General and Comparative Endocrinology**, v. 166, p. 94-103, 2010.
- PIANA, R. P. Nesting and diet of *Harpia harpyja* Linnaeus in the Native Community of Infierno, Madre de Dios, Peru. **Revista Peruana de Biología**, v.14 p. 135–138, 2007.
- REHDER, N. B.; BIRD, D. M.; SANFORD, L. M. Plasma androgen levels and body weights for breeding and nonbreeding male American kestrels. **Condor**, v. 90, p. 555– 560, 1988.
- RETTIG, N. L. Breeding behavior of the harpy eagle (*Harpia harpyja*). **Auk**, v.95 p. 629-643, 1978.
- RINALDI, A. R. **Ecologia de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Linnaeus, 1766) em região alterada pela formação de um reservatório hidrelétrico**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 200p. 2014.
- SCHWARZENBERGER, F.; BROWN, J. L. Hormone monitoring: An important tool for the breeding management of wildlife species. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 100, p. 209-225, 2013.
- SOCKMAN, K. W.; SCHWABL, H.; SHARP, P. J. Removing the confound of time in investigating the regulation of serial behaviors: testosterone, prolactin and the transition from sexual to parental activity in male American kestrels. **Animal Behaviour**, v. 67, p. 1151–1161, 2004.
- STALEY, A. M.; BLANCO, J. M.; DUFTY, A. M.; WILDT, D. E.; MONFORT, S. L. Fecal steroids monitoring for assessing gonadal and adrenal activity in the golden eagle and peregrine falcon. **J Comp Physiol B; Bioch, Sys, and Env Physiol**, v. 177, p. 609-622.
- TEMPEL, D. J.; GUTIÉRREZ, R. J. Factors related to fecal corticosterone levels in California spotted owls: implications for assessing chronic stress. **Conserv. Biol.**, v. 18, f. 2, p. 538-547, 2004.
- TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 1046, p. 54–74, 2005.



UBAID, F. K.; FERREIRA, L. P.; OLIVEIRA-JUNIOR, S. B.; ANTAS, P. T. Z. Primeiro registro de *Harpia harpyja* para o bioma Pantanal, com dados sobre atividade reprodutiva. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.19, p.88-92, 2011.

WIKELSKI, M.; HAU, M.; WINGFIELD, J. C. Seasonality of reproduction in Neotropical rain forest bird. **Ecology**, v. 81, p. 2458–2472, 2000.

WINGFIELD, J. C.; HAHN, T. P.; LEVIN, R.; HONEY, P. Environmental predictability and control of gonadal cycles in birds. **J. Exp. Zool**, v. 261, p. 214–231, 1992.

WINGFIELD, J. C.; VISSER, M. E.; WILLIAMS, T. D. Integration of ecology and endocrinology in avian reproduction: a new synthesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B**, v. 363, p. 1581–1588, 2008.





## ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38990-2	Data da Emissão: 14/05/2014 00:13	Data para Revalidação*: 13/06/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: Marcel Henrique Blank	CPF: 080.649.719-00
Título do Projeto: Concentração de esteroides sexuais e acompanhamento reprodutivo anual em harpias ( <i>Harpia harpyja</i> Linnaeus, 1758) mantidas em cativeiro.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de fezes em Harpias ( <i>Harpia harpyja</i> )	06/2013	08/2014

## Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

## Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	FOZ D'IGUAÇU	PR	Refúgio Biológico Bela Vista, ITAIPU BINACIONAL	Fra de UC Federal

## Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Harpia harpyja

## Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes
---	----------------------------	-------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 37522861



Página 1/4



## Anexos



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

**Autorização para atividades com finalidade científica**

Número: 38990-2	Data da Emissão: 14/05/2014 00:13	Data para Revalidação*: 13/06/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

**Dados do titular**

Nome: Marcel Henrique Blank	CPF: 080.649.719-00
Título do Projeto: Concentração de esteroides sexuais e acompanhamento reprodutivo anual em harpias ( <i>Harpia harpyja</i> Linnaeus, 1758) mantidas em cativeiro.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

**Destino do material biológico coletado**

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 37522861**

Página 2/4

Marcel Henrique Blank  
PPGZOO/UFPR



## Anexos



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

**Autorização para atividades com finalidade científica**

Número: 38990-2	Data da Emissão: 14/05/2014 00:13	Data para Revalidação*: 13/06/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

**Dados do titular**

Nome: Marcel Henrique Blank	CPF: 080.649.719-00
Título do Projeto: Concentração de esteroides sexuais e acompanhamento reprodutivo anual em harpias ( <i>Harpia harpyja</i> Linnaeus, 1758) mantidas em cativeiro.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

**Registro de coleta imprevista de material biológico**

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 37522861**

Página 3/4

Marcel Henrique Blank  
PPGZOO/UFPR